

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ :</p> <p>C07D 213/30, 213/38, 213/40, 215/14, 215/12, 471/04, A61K 31/47, C07D 213/36, 471/14, A61K 31/475</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/05642</p> <p>(43) Date de publication internationale: 12 février 1998 (12.02.98)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01436</p> <p>(22) Date de dépôt international: 31 juillet 1997 (31.07.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/09721 1er août 1996 (01.08.96) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BECQ, Frédéric [FR/FR]; 7, rue des Etuves, F-13100 Aix en Provence (FR). METTEY, Yvette [FR/FR]; 4, chemin du Miosson, F-86280 Saint-Benoît (FR). VIERFOND, Jean-Michel [FR/FR]; 2, rue Molière, F-94700 Maisons Alfort (FR). VERRIER, Bernard [FR/FR]; La Romiguière, F-13360 Roquevaire (FR). GOLA, Maurice [FR/FR]; 17, Les Jardins d'Eoures, F-13400 Aubagne (FR).</p> <p>(74) Mandataires: DEMACHY, Charles etc.; Grosset-Fournier & Demachy S.a.r.l., 103, rue La Fayette, F-75481 Paris Cedex 10 (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: CFTR CHANNEL ACTIVATOR COMPOUNDS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME</p> <p>(54) Titre: COMPOSES ACTIVATEURS DU CANAL CFTR, ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>CFTR channel activator compounds from the benzo[c]quinolizinium family or families of compounds derived therefrom, as well as pharmaceutical compositions containing said compounds, and the uses thereof, particularly for treating cystic fibrosis, are disclosed.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention a pour objet des composés activateurs du canal CFTR, appartenant à la famille des benzo[c]quinoliziniums, ou à des familles de composés dérivées de cette dernière, ainsi que les compositions pharmaceutiques contenant ces composés, et leurs utilisations, notamment dans le cadre du traitement de la mucoviscidose.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

COMPOSES ACTIVATEURS DU CANAL CFTR, ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT

5 La présente invention a pour objet des composés activateurs du canal CFTR, des compositions pharmaceutiques contenant ces derniers, ainsi que leur utilisation dans le cadre du traitement de pathologies telles que la mucoviscidose.

10 Dans une cellule épithéliale, les transports d'eau et d'électrolytes sont associés à une augmentation des perméabilités membranaires pour les ions K^+ , Na^+ et Cl^- . Ces mouvements sont liés à l'activité des canaux ioniques, à savoir des protéines spécialisées, intégrés dans la membrane permettant la diffusion passive des ions. Les techniques d'électrophysiologie moléculaire (patch-clamp) permettent l'enregistrement au niveau unitaire des ouvertures et des fermetures
15 d'un canal ionique et rendent possible l'étude des transports ioniques transépithéliaux, de leurs régulations et de leurs dérèglements pathologiques.

Parmi les nombreuses pathologies associées à la physiologie des cellules épithéliales, la mucoviscidose est considérée également comme une pathologie des canaux ioniques dans la mesure où la protéine impliquée est un canal
20 chlorure, le canal CFTR pour "Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator". La mucoviscidose ou Cystic Fibrosis (CF) dans la terminologie Anglo-saxonne est la maladie génétique autosomique récessive la plus commune dans les populations caucasiennes. Aux Etats-Unis et dans la plupart des pays d'Europe, la fréquence des porteurs du gène CF est de 1 sur 20 à 1 sur 30. La
25 mucoviscidose affecte les glandes exocrines de l'organisme humain. Les principaux sites d'expression de la protéine CFTR sont le pancréas exocrine, les poumons, les glandes sudoripares, l'intestin et le tissu cardiaque. L'intérêt porté à cette maladie a eu des conséquences importantes pour la compréhension des mécanismes sécrétoires des cellules épithéliales normales. Les cellules
30 épithéliales des glandes exocrines de l'intestin, du pancréas ou des poumons contrôlent le transport de sel et d'eau dans ces organes. Dans la mucoviscidose, des mutations du gène CF altèrent les propriétés et la fonction du canal CFTR. Le transport électrolytique devient alors anormal et conduit à des troubles obstructifs chroniques pulmonaires, à une insuffisance pancréatique, à des affections bactériennes pulmonaires, à une sécrétion sudoripare anormalement
35 concentrée et à une infertilité masculine. Le défaut de sécrétion est lié au fonctionnement de canaux ioniques sélectifs pour les ions chlorure (canaux

CFTR), localisés dans la membrane apicale des cellules et dont l'activité est contrôlée par la voie de l'AMP cyclique.

La protéine CFTR est une glycoprotéine de 1480 amino-acides, d'un poids moléculaire de 170 kD répartis en cinq domaines (Riordan et al., 1989), deux segments transmembranaires avec chacun 6 hélices alpha (numérotées de 1 à 12 comportant chacune de 21 à 22 amino acides), deux domaines de fixation des nucléotides (NBF1 et 2) et un large domaine hydrophile de régulation (domaine R). La protéine CFTR, de par sa structure moléculaire appartient à la famille des transporteurs membranaires (ABC pour ATP-binding cassette).

Les transporteurs ABC constituent une famille de protéines membranaires très conservées dans l'évolution. Elles sont impliquées dans la translocation de substrats variés à travers les membranes cellulaires. Cependant, alors que chez les procaryotes de nombreux couples transporteurs/substrats ont été définis, ces informations sont plus rares chez les eucaryotes. Chez les mammifères, la plupart des transporteurs ABC sont associés à une pathologie. Citons la protéine CFTR impliquée dans la mucoviscidose, la P glycoprotéine (MDR ; Multi Drug Resistance) impliquée dans le rejet de drogues cytotoxiques antitumorales et la protéine ABC1, nouvellement décrite qui joue un rôle essentiel dans l'endocytose de corps apoptotiques par le macrophage. La CFTR contrôle le transport de chlorure transépithélial et l'hydratation des compartiments muqueux, alors qu'une des isoformes de la MDR est impliquée dans la translocation de la phosphatidylcholine. Ces trois protéines ABC qui ont une structure à deux fois 6 segments transmembranaires, disposent de deux domaines qui lient et hydrolysent les nucléotides (NBF) et d'un domaine régulateur. La régulation de la CFTR a été particulièrement étudiée.

Deux processus complexes contrôlent l'activité du canal CFTR : la phosphorylation du domaine R par des protéines kinases et la fixation (et peut-être l'hydrolyse) d'ATP sur les deux domaines NBF. La déphosphorylation du canal CFTR entraîne une perte d'activité du canal jusqu'à sa fermeture (Tabcharani et al., 1991, Becq et al., 1993a, Becq et al., 1994). En outre, le canal CFTR est associé à une phosphatase membranaire qui contrôle l'activité et l'état de phosphorylation du canal (Becq et al., 1993b, Becq et al., 1994).

Le gène codant pour la protéine CFTR, a été isolé par clonage moléculaire et identifié sur le chromosome 7 (Kerem et al., 1989, Riordan et al., 1989). L'identification du gène et son implication dans la mucoviscidose ont été confirmés par la localisation d'une délétion de trois paires de bases dans une région codante (exon 10) du gène CF provenant de patients CF. Cette mutation

correspond à la délétion d'une phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$) de la protéine dans le NBFI. La fréquence d'apparition de cette mutation est de 70% en moyenne dans les analyses génétiques (Tsui & Buchwald, 1991). Les conséquences de cette mutation sont dramatiques car la protéine anormale issue de la transcription du gène muté ($\Delta F508$) n'est plus capable d'assurer ses fonctions dans le transport de chlorure des cellules épithéliales affectées. L'absence de courant chlore après stimulation des cellules épithéliales des glandes exocrines par l'AMPc est la principale caractéristique montrant la présence d'une anomalie sur le gène CF et notamment de la mutation ($\Delta F508$). Plus de 300 mutations ont été identifiées à ce jour sur le gène CF. La densité de mutations la plus élevée se trouve dans les deux domaines de fixation des nucléotides. La mutation ($\Delta F508$) se retrouve dans 70% des cas et 50% des patients sont homozygotes pour cette mutation. Sept autres mutations importantes sont présentes avec des fréquences supérieures à 1%. La mutation G551D correspond à la substitution d'un résidu glycine (G) en position 551 de la protéine par un acide aspartique (D). Les patients porteurs de ce mutant ont une pathologie sévère avec une insuffisance pancréatique et des troubles pulmonaires graves (Cutting et al., 1990). La fréquence d'observation de cette mutation atteint 3 à 5% chez certaines populations CF. A l'inverse de la délétion $\Delta F508$, la protéine CFTR portant la mutation G551D est mature et est incorporée dans la membrane (Gregory et al., 1991). Cependant, la mutation entraîne une imperméabilité membranaire et la stimulation de la voie de l'AMPc n'ouvre pas le canal associé à l'expression de ce mutant (Gregory et al., 1991, Becq et al., 1994).

D'autres mutations comme R117H, R334W et R347P apparaissent avec des fréquences basses de 0.8, 0.4 et 0.5% respectivement et sont associées à une pathologie moins grave (Sheppard et al., 1993). L'expression de ces trois mutants génère une forme mature glycosylée de la protéine en accord avec son insertion dans la membrane.

Les trois mutants sont capables toutefois de répondre à une stimulation de la voie de l'AMP par l'ouverture des canaux. L'amplitude des courants, la conductance unitaire et la probabilité d'ouverture du canal associé avec chacun des trois mutants sont modifiées par rapport au canal CFTR normal (Sheppard et al., 1993, Becq et al., 1994). La régulation par les kinases/phosphatases semble toutefois normale pour ces différents mutants, y compris les mutants G551D et $\Delta F508$ (Becq et al., 1994).

Ainsi, ces observations montrent qu'il est possible pharmacologiquement d'activer un grand nombre de mutants CFTR, y compris G551D et Δ F508. Malgré un défaut d'adressage de la protéine Δ F508 dans les membranes des cellules épithéliales affectées par la mucoviscidose plusieurs groupes ont montré
5 que cette protéine pouvait être présente de façon fonctionnelle dans les membranes (Dalemans et al., 1991, Drumm et al., 1991, Becq et al., 1994). Ainsi, il apparaît nécessaire et primordial de développer une stratégie d'ouvriers du canal CFTR pour optimiser les chance de succès d'une thérapie mais aussi pour remplacer la thérapie génique lorsque celle-ci n'est pas
10 nécessaire (mutations autres que Δ F508).

Malgré les progrès réalisés sur la génétique de la mucoviscidose, la biologie et la biochimie de la protéine CFTR, la pharmacologie des ouvriers du canal CFTR est peu développée. Trois familles de molécules sont aujourd'hui mise en avant pour leurs propriétés d'activateurs ou d'ouvriers du canal CFTR :
15 les phénylimidazothiazoles (lévamisole et bromotétramisole), les benzimidazolones (NS004) et les xanthines (IBMX, théophylline...).

1) les phénylimidazothiazoles (lévamisole et bromotétramisole)

Il a été récemment montré que le lévamisole et le bromotétramisole permettent, en inhibant une phosphatase membranaire, un contrôle de l'activité
20 et du niveau de phosphorylation du canal CFTR (Becq et al., 1994.). Ces composés ouvrent le canal CFTR de manière dose-dépendante (Becq et al 1996) et agissent sur le canal CFTR présentant des mutations à l'origine de la maladie (Becq et al., 1994). Le mode d'action de ces activateurs est encore incertain. Ces molécules n'agissent pas par les voies classiques de l'AMPc ou du calcium
25 intracellulaire. Les composés de la famille du bromotétramisole ont déjà une utilisation thérapeutique (Grem, 1990) et le lévamisole est utilisé dans certaines thérapies pulmonaires (Van Eygen et al., 1976, Dils, 1979). Ces dernières propriétés représentent un avantage certain pour amorcer des tests en clinique. Toutefois ces molécules ne semblent pas pouvoir agir dans toutes les cellules.
30 Les cellules intestinales répondent mal et l'ouverture du CFTR après expression dans l'ovocyte de *Xenope* ne peut pas être déclenchée. De plus, dans un modèle de souris transgéniques présentant la mutation G551D/G551D, le bromotétramisole n'a pas l'effet activateur attendu. Les effets de ces molécules semblent donc limités.

35 2) Les benzimidazolones (NS004)

Récemment, Gribkoff et al., 1994 ont montré que le NS004, un composé (benzimidazolone) dérivé du noyau imidazole comme le lévamisole peut dans

certaines conditions (lorsque le CFTR a été phosphorylé) ouvrir le canal. Les benzimidazolones sont toutefois également activateurs de nombreux canaux potassium (Olesen et al., 1994) et sont de ce fait peu spécifiques pour le CFTR.

3) Les xanthines (IBMX, théophylline ...).

Les xanthines comme l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) sont des activateurs du CFTR. Le mécanisme d'action est encore mal connu et plusieurs possibilités existent. Les xanthines peuvent en inhibant les phosphodiesterases intracellulaires (enzymes de dégradation de l'AMPc) faire augmenter le taux d'AMPc et donc activer CFTR. D'autres possibilités sont aujourd'hui avancées comme la fixation des xanthines sur les sites de fixation pour les nucléotides (NBF) du CFTR.

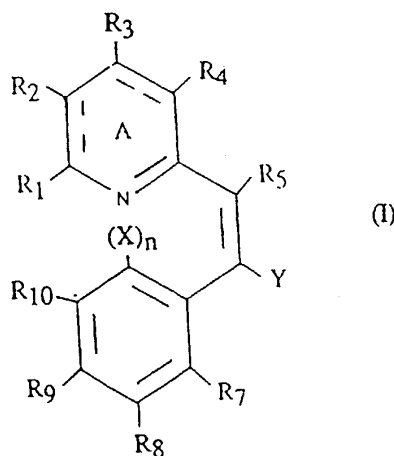
La présente invention a pour but de fournir des composés activateurs du canal CFTR qui sont davantage spécifiques du CFTR que les composés activateurs du canal CFTR décrits jusqu'à maintenant.

A ce titre, la présente invention a pour but de fournir de nouveaux médicaments destinés au traitement de pathologies associées à des troubles des flux ioniques transmembranaires, notamment de chlore, dans les cellules épithéliales d'un organisme humain ou animal.

La présente invention a plus particulièrement pour but de fournir de nouveaux médicaments susceptibles d'être utilisés dans le cadre du traitement de la mucoviscidose, de la prévention du rejet de drogues cytotoxiques (notamment antitumorales), ou de la prévention ou du traitement des obstructions des voies bronchiques ou des voies digestives (notamment pancréatique ou intestinale) ou encore dans le cadre du traitement de maladies cardio-vasculaires.

Un autre but de la présente invention est celui de fournir un procédé de préparation des composés et compositions pharmaceutiques de l'invention.

La présente invention a pour objet l'utilisation de composés de formule générale (I) suivante :



dans laquelle :

- l'hétérocycle A est aromatique ou non, étant entendu que dans ce dernier cas l'atome d'azote de cet hétérocycle est lié par une double liaison au carbone en position 4a,

- R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 et R_{10} , représentent, indépendamment les uns des autres :

. un atome d'hydrogène, ou de brome, ou de fluor, ou

. un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, ou

. un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, d'environ 1 à environ 10 atomes de carbone, ces groupes étant le cas échéant substitués, notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un cycle aromatique et/ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ces cycles étant eux-mêmes, le cas échéant, substitués notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

. un cycle aromatique ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ce cycle étant lui-même, le cas échéant, substitué notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

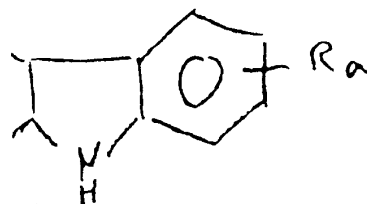
. un groupe $-OR_a$, R_a représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. un groupe $-NR_bR_c$, R_b et R_c , indépendamment l'un de l'autre, représentant un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. lorsque R_1 et R_2 , ou R_3 et R_4 , et/ou R_4 et R_5 , et/ou R_7 et R_8 , et/ou R_8 et R_9 , et/ou R_9 et R_{10} , ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_1 en association avec R_2 , ou R_2 en association avec R_3 , et/ou R_3 en association avec R_4 , et/ou R_4 en association avec R_5 , et/ou R_7 en association avec R_8 , et/ou R_8 en association avec R_9 ,

et/ou R₉ en association avec R₁₀, forment respectivement avec C₁ et C₂, ou avec C₂ et C₃, ou avec C₃ et C₄, ou avec C₄, C_{4a} et C₅, ou avec C₇ et C₈, ou avec C₈ et C₉, ou avec C₉ et C₁₀, un cycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, ce cycle étant le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

lorsque R₃ et R₄ ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R₃ en association avec R₄ forment un groupe indole de formule



dans laquelle R_a est tel que défini ci-dessus,

- Y représente :

un groupe -OR_d, R_d représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

un groupe -NR_eR_f, R_e et R_f indépendamment l'un de l'autre, représentant un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus,

étant entendu que lorsque R_d, ou l'un au moins de R_e ou de R_f, ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_d, ou l'un au moins de R_e ou de R_f, en association avec R₅, ou en association avec R₇, forment respectivement avec C₅ et C₆, ou avec C₆, C_{6a} et C₇, un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

- n est égal à 0 ou 1, avec :

. lorsque n est égal à 0 :

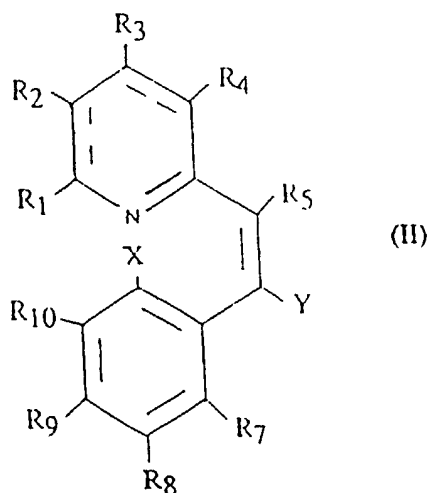
* X représente un atome sous forme anionique, tel qu'un atome d'halogène, notamment un atome de brome ou de chlore, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, tel qu'un perchlorate, et l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I) est sous forme quaternaire et est lié d'une part par liaison covalente au carbone en position 11, et, d'autre part, par liaison ionique à X défini ci-dessus,

* étant entendu que lorsque R_1 et R_{10} ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_1 en association avec R_{10} forment avec C_1 , l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I), C_{11} , et C_{10} , un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

. lorsque n est égal à 1, alors X représente un atome d'hydrogène, ou un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor,

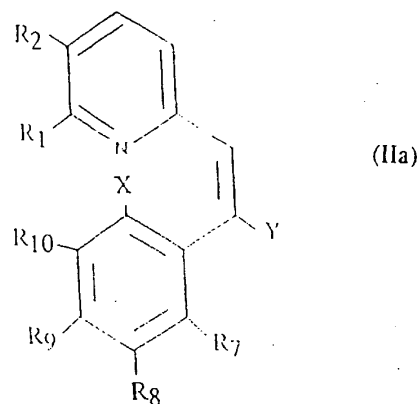
pour la préparation de médicaments destinés au traitement de pathologies, notamment pulmonaires, digestives ou cardiaques, liées à des troubles des flux ioniques transmembranaires, notamment de chlore et, le cas échéant, de bicarbonate, dans l'organisme (humain ou animal), notamment pour la préparation de médicaments destinés au traitement de la mucoviscidose, ou à la prévention du rejet de drogues cytotoxiques (notamment antitumorales), ou au traitement des obstructions des voies bronchiques ou des voies digestives (notamment pancréatique ou intestinale)

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation telle que décrite ci-dessus, de composés de formule générale (I) dans laquelle $n = 1$, et correspondant aux dérivés de formule générale (II) suivante :



dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , X et Y sont tels que définis ci-dessus.

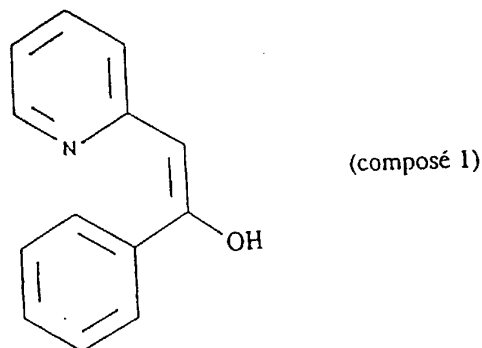
A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation telle que décrite ci-dessus, de composés de formule générale (IIa) suivante :



dans laquelle :

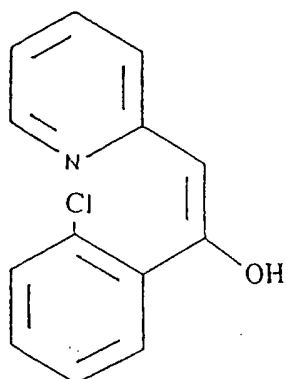
- R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C_1 et C_2 un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,
- Y représente un groupe -OH ou -NH₂,
- R_7 , R_8 , R_9 et R_{10} représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} , représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- X représente un atome d'hydrogène ou un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor.

Des composés de formule générale (IIa) avantageusement utilisés dans le cadre de la présente invention, sont ceux choisis parmi les suivants :



10

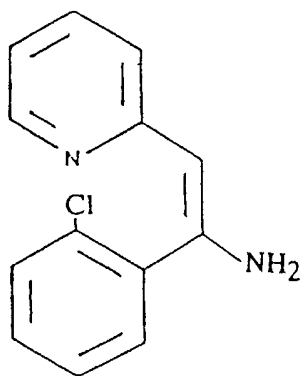
5



(composé 2)

10

15

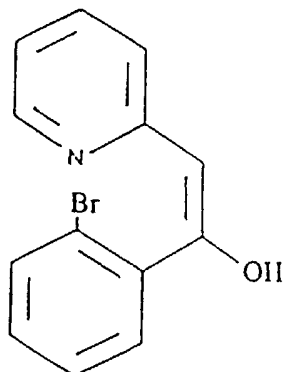


(composé 3)

20

25

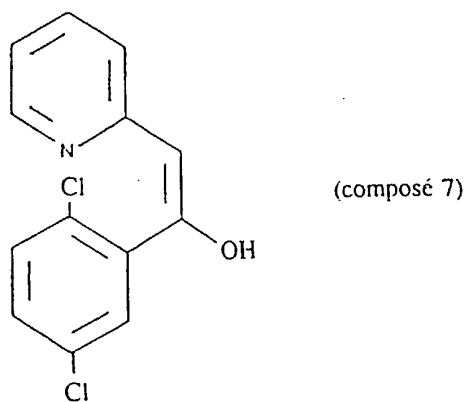
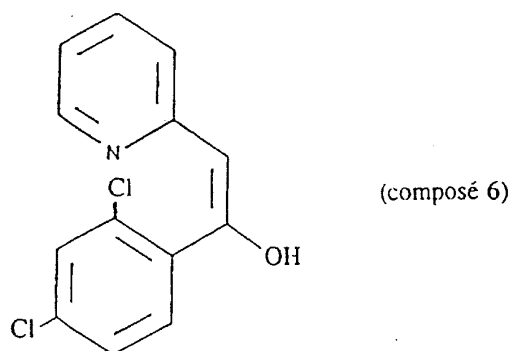
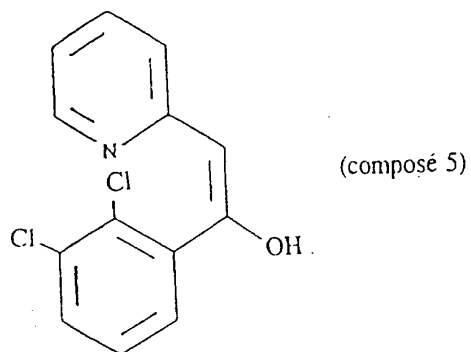
30



(composé 4)

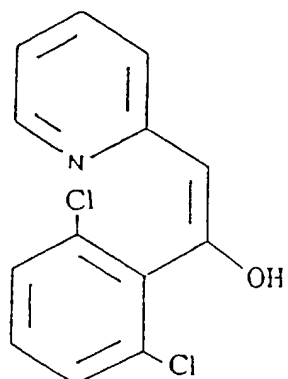
35

11



5

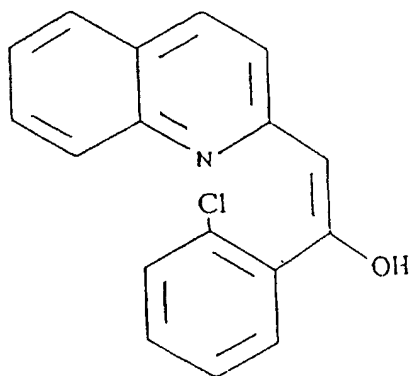
10



(composé 8)

15

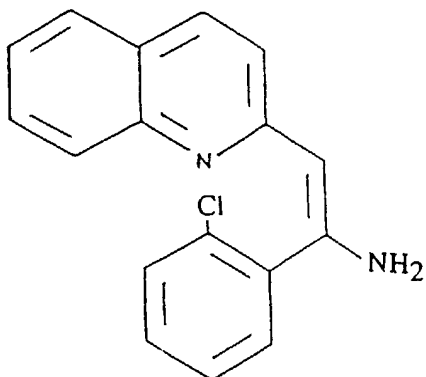
20



(composé 9)

25

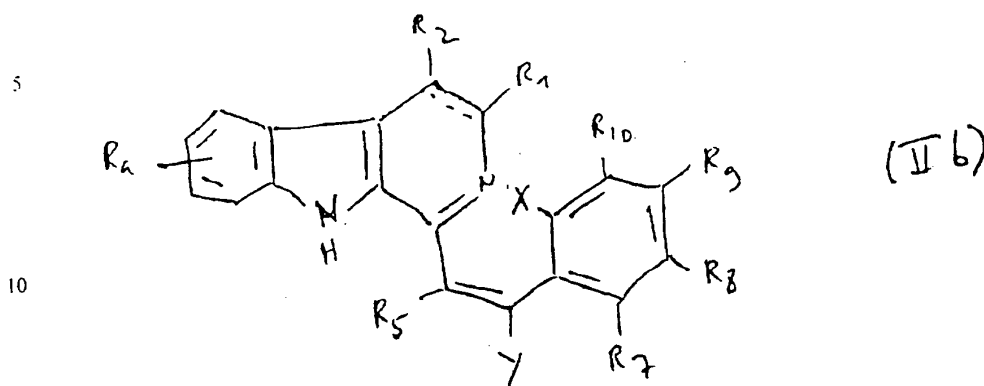
30



(composé 10)

35

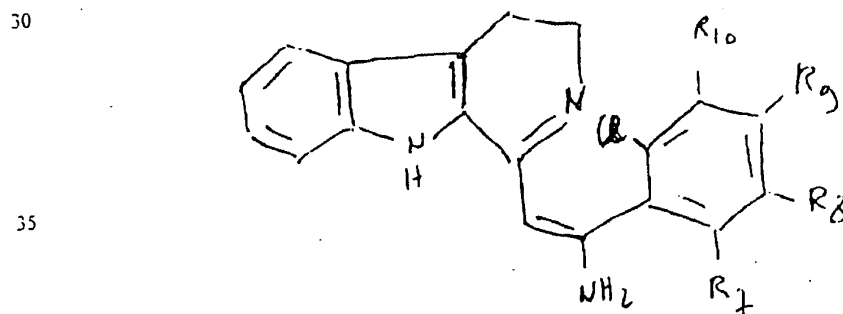
L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation telle que décrite ci-dessus, de composés de formule générale (IIb) suivante :



15 dans laquelle R_A , R_1 , R_2 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , X et Y sont tels que définis ci-dessus, et notamment les composés de formule (IIb) dans laquelle :

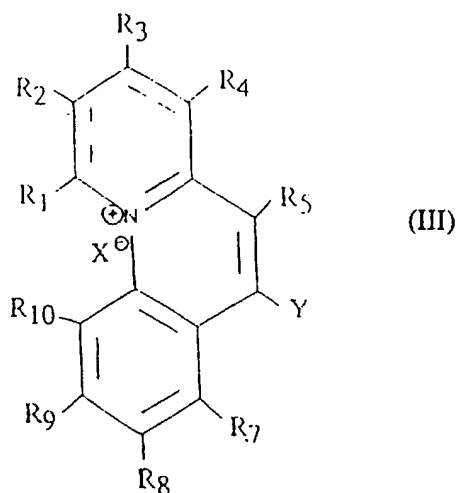
- R_A représente un atome d'hydrogène,
- R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène, et il n'y a pas de double liaison entre les deux carbones portant R_1 et R_2 ,
- R_5 représente un atome d'hydrogène,
- R_7 , R_8 , R_9 et R_{10} représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- Y représente $-NH_2$,
- X représente un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor.

Des composés de formule (IIb) avantageusement utilisés dans le cadre de la présente invention, sont ceux choisis parmi les suivants :



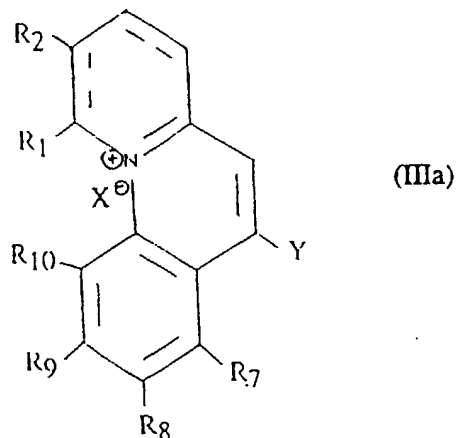
- composé A : $R_7 = \text{Cl}$, $R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé B : $R_7 = R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé C : $R_8 = \text{Cl}$, $R_7 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé D : $R_9 = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$,
- composé E : $R_{10} = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_9 = \text{H}$,
- composé F : $R_9 = \text{Br}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation telle que décrite ci-dessus, de composés de formule générale (I) dans laquelle $n = 0$, et correspondant aux dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (III) suivante :



dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , X et Y sont tels que définis ci-dessus.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation telle que décrite ci-dessus, de composés de formule générale (IIIa) suivante :



dans laquelle :

- R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C₁ et C₂ un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,

5 - Y représente un groupe -OH ou -NH₂, ou -NHCOCH₃.

- R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R₇, R₈, R₉ ou R₁₀, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

10 - X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, notamment un perchlorate ClO₄⁻.

Des composés particulièrement préférés dans le cadre de la présente invention sont ceux de formule (IIIa) dans laquelle :

15 - R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène,

- Y représente un groupe -OH,

- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, notamment un perchlorate ClO₄⁻,

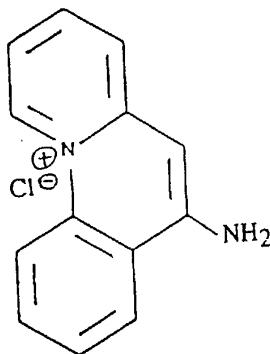
20 - R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent indépendamment les uns des autres un atome d'hydrogène ou un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor.

Des composés de formule générale (IIIa) avantageusement utilisés dans le cadre de la présente invention, sont ceux choisis parmi les suivants :

25

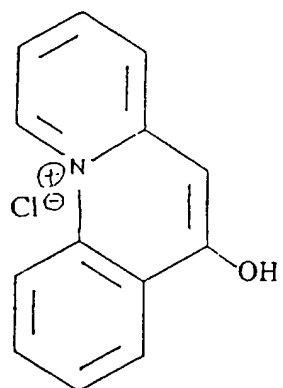
30

35



(composé 11 ou MPB-26)

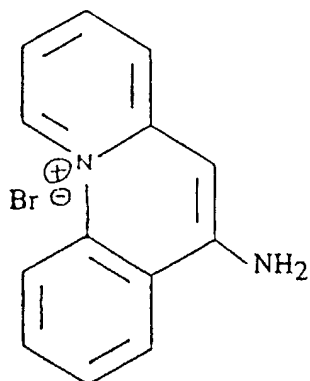
5



(composé 12 ou MPB-05)

10

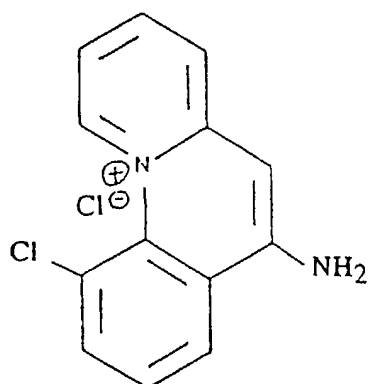
15



(composé 13 ou MPB-01)

20

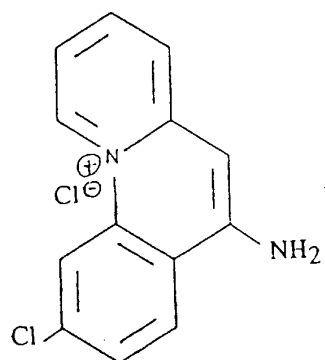
25



(composé 14 ou MPB-02)

35

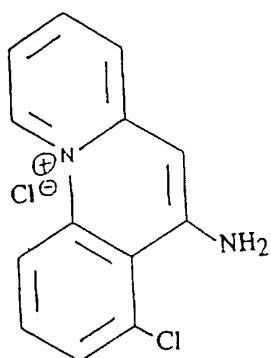
5



(composé 15 ou MPB-03)

10

15

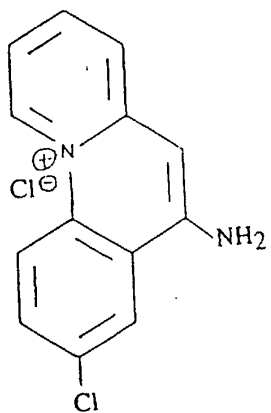


(composé 16)

20

25

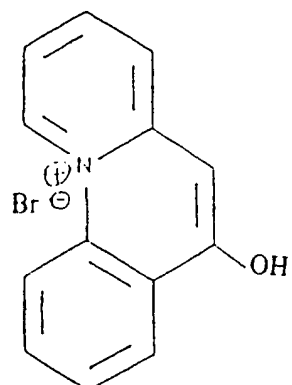
30



(composé 17)

35

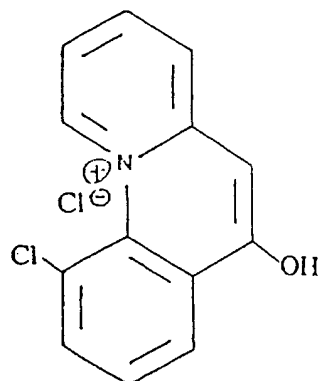
5



(composé 18 ou MPB-06)

10

15

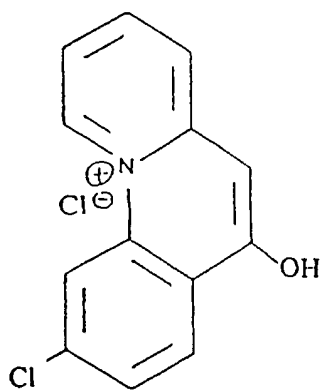


(composé 19 ou MPB-07)

20

25

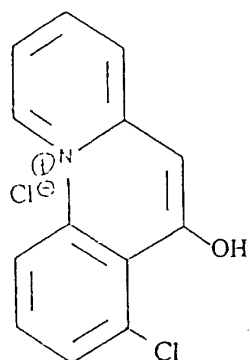
30



(composé 20 ou MPB-08)

35

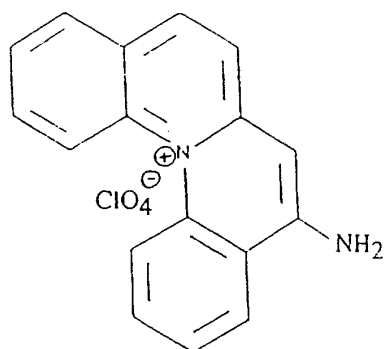
5



(composé 21 ou MPB-27)

10

15

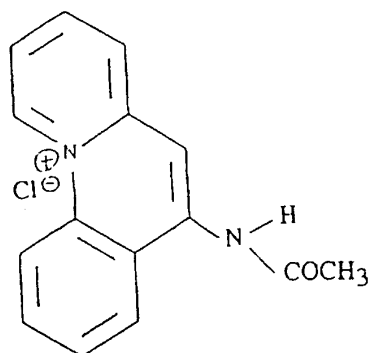


(composé 22)

20

25

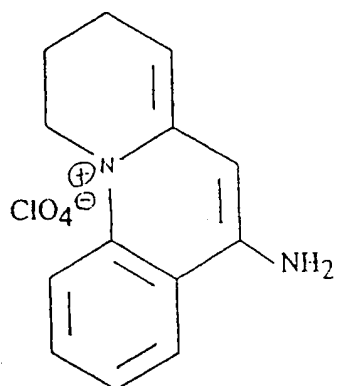
30



(composé 23)

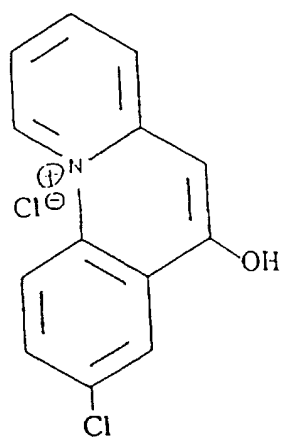
35

5



10

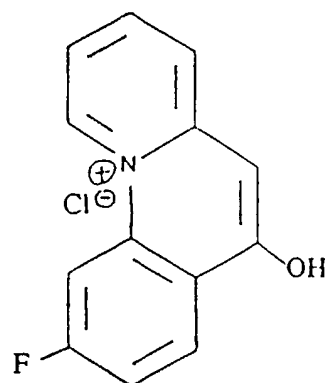
15



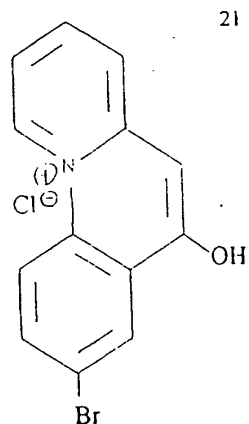
20

25

30

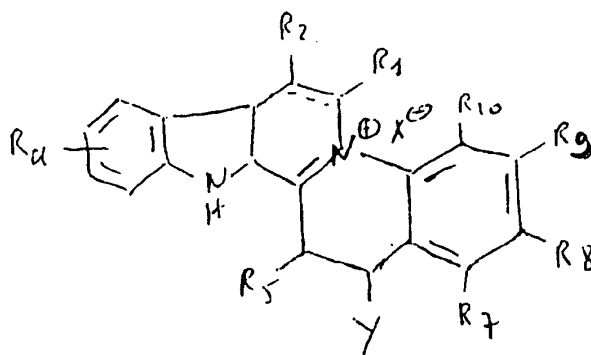


35



(composé 27 ou MPB-32)

L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation telle que décrite ci-dessus, de composés de formule générale (IIIb) suivante :

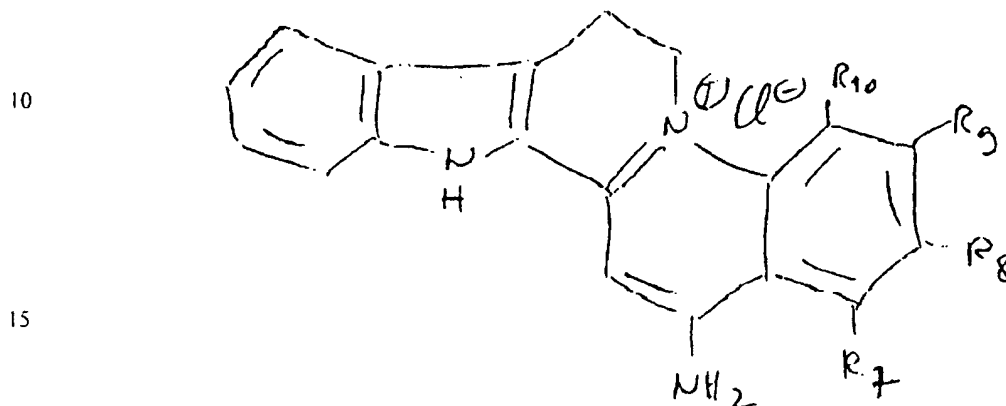


dans laquelle R_4 , R_1 , R_2 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , X et Y sont tels que définis ci-dessus, et notamment les composés de formule (IIIb) dans laquelle :

- R_4 représente un atome d'hydrogène,
- R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène, et il n'y a pas de double liaison entre les deux carbones portant R_1 et R_2 ,
- R_5 représente un atome d'hydrogène,
- R_7 , R_8 , R_9 et R_{10} représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- Y représente $-NH_2$,

- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br^- , ou de chlore Cl^- , ou un groupe d'atomes sous forme anionique, notamment un perchlorate ClO_4^- .

Des composés de formule (IIIb) avantageusement utilisés dans le cadre de la présente invention, sont ceux choisis parmi les suivants :



- composé G : $R_7 = \text{Cl}$, $R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé H : $R_7 = R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé I : $R_8 = \text{Cl}$, $R_7 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé J : $R_9 = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$,
- composé K : $R_{10} = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_9 = \text{H}$,
- composé L : $R_9 = \text{Br}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$.

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe(s) actif(s), au moins un des composés de formule générale (I) décrite ci-dessus, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute composition pharmaceutique telle que décrite ci-dessus, comprenant, à titre de principe(s) actif(s), au moins un des composés de formule (II), et plus particulièrement de formule (IIa), tels que définis ci-dessus, et notamment au moins un des composés 1 à 10 décrits ci-dessus, et plus particulièrement encore de formule (IIb), tels que définis ci-dessus, et notamment au moins un des composés A à F décrits ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute composition pharmaceutique telle que décrite ci-dessus, comprenant, à titre de principe(s) actif(s), au moins un des composés de formule (III), et plus particulièrement de formule (IIIa), tels que définis ci-dessus, et notamment au moins un des composés 11 à 27 décrits ci-dessus, et plus particulièrement encore de formule (IIIb), tels que définis ci-dessus, et notamment au moins un des composés G à L décrits ci-dessus.

Des compositions pharmaceutiques préférées de l'invention sont celles comprenant le composé 19 (encore désigné MPB-07), le cas échéant en association avec un (ou plusieurs) autre(s) composé(s) de l'invention décrit(s) ci-dessus.

Avantageusement les compositions pharmaceutiques selon l'invention se présentent sous une forme administrable par voie orale, notamment sous forme de comprimés, ou de gélules, ou sous une forme administrable par voie parentérale, notamment sous forme de préparations injectables par voie intraveineuse, intramusculaire, ou sous-cutanée, ou encore par voie aérienne, notamment par voie pulmonaire sous forme d'aérosols.

Avantageusement encore, les compositions pharmaceutiques selon l'invention, sont caractérisées en ce que les quantités de principe(s) actif(s) sont telles que la posologie journalière en principe(s) actif(s) est d'environ 0,1 mg/kg à 5 mg/kg, notamment d'environ 3 mg/kg, en une ou plusieurs prises.

L'invention concerne également les composés de formule générale (I) décrite ci-dessus, en tant que tels, à l'exclusion des composés 2, 3, 9, 10, 11 (ou MPB-26), 12 (ou MPB-5), 22, 23 et 24 décrits ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet des composés de formule générale (I) décrite ci-dessus, dans laquelle $n = 1$, et correspondant aux composés de formule générale (II) décrite ci-dessus, à l'exclusion des composés 2, 3, 9 et 10.

L'invention concerne plus particulièrement les composés de formule générale (IIa) décrite ci-dessus, dont notamment les composés 1, 4, 5, 6, 7 et 8 décrits ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement encore les composés de formule générale (IIb) décrite ci-dessus, dont notamment les composés A à F décrits ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet les composés de formule générale (I) décrite ci-dessus, dans laquelle $n = 0$, et correspondant aux dérivés

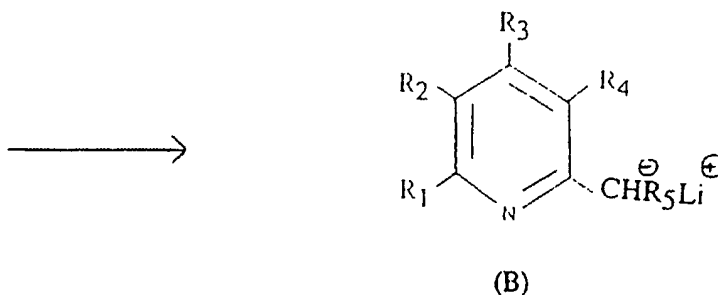
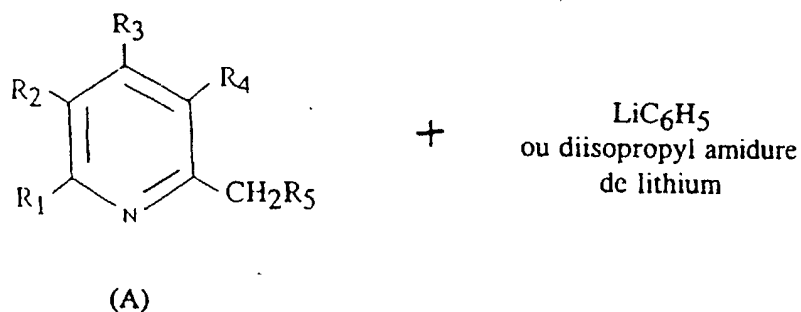
des benzo[c]quinoliziniums de formule (III) décrite ci-dessus, à l'exclusion des composés 11, 12, 22, 23 et 24.

L'invention concerne plus particulièrement les composés de formule générale (IIIa) décrite ci-dessus, dont notamment les composés 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 25, 26 et 27 décrits ci-dessus.

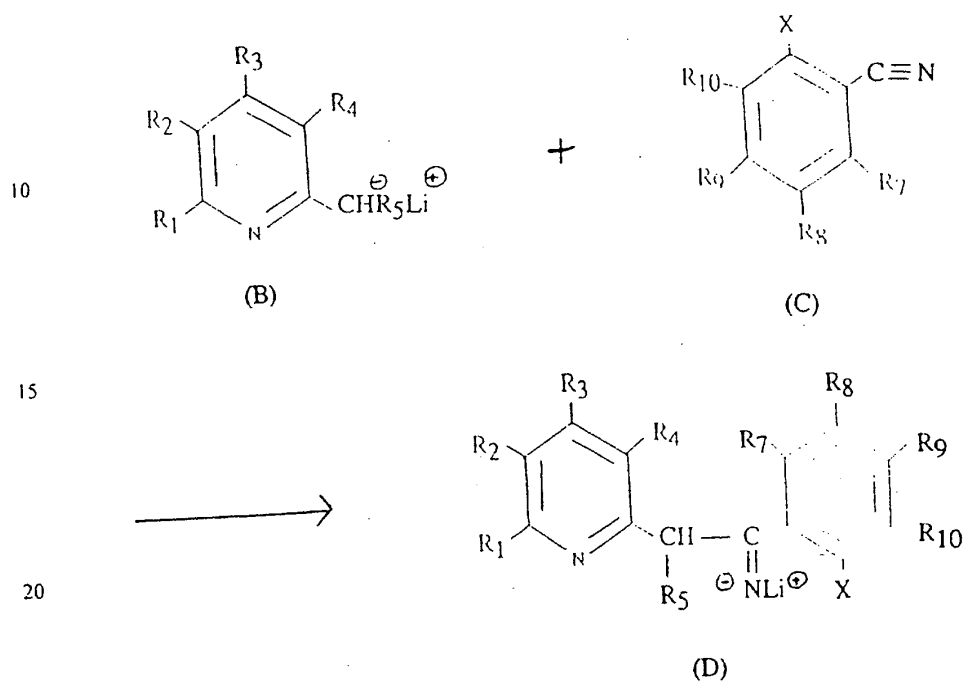
L'invention concerne plus particulièrement encore les composés de formule générale (IIIb) décrite ci-dessus, dont notamment les composés G à L décrits ci-dessus.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation des composés de formule générale (I), caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

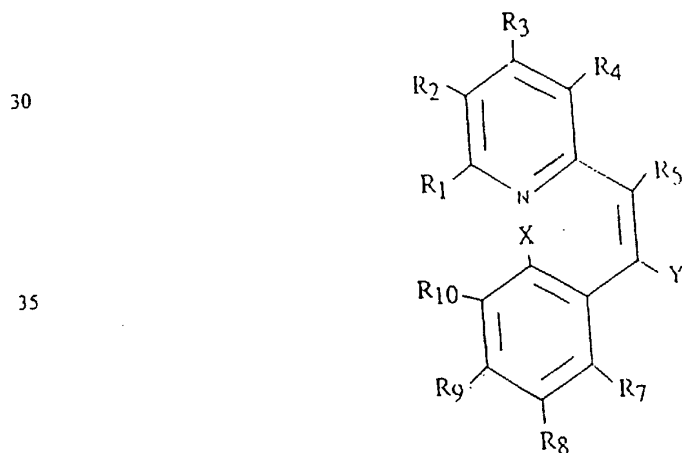
- traitement du dérivé de formule (A) dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , et R_5 , sont tels que définis dans la formule (I), par le phényllithium ou le diisopropyl amidure de lithium, avantageusement dans l'éther ou le THF, ce qui conduit à l'obtention de dérivés de formule (B) dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , et R_5 , sont tels que définis dans la formule (I), selon le schéma réactionnel suivant:



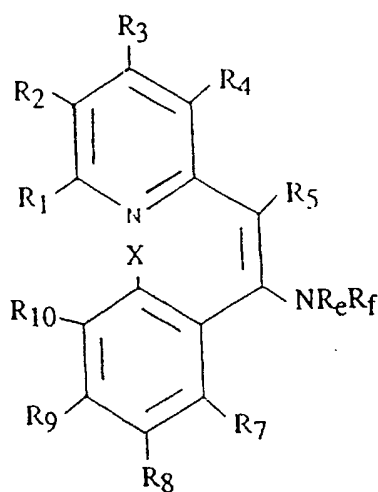
- condensation du dérivé de formule (B) obtenu à l'étape précédente avec le dérivé de formule (C) dans laquelle R₇, R₈, R₉, R₁₀, et X sont tels que définis dans la formule (I), ce qui conduit à l'obtention de dérivés de formule (B) dans laquelle R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₇, R₈, R₉, R₁₀, et X sont tels que définis dans la formule (I), selon le schéma réactionnel suivant :



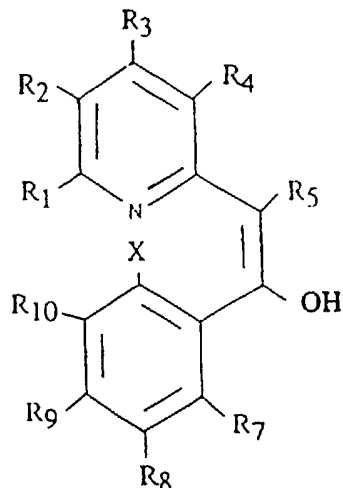
- traitement du composé de formule (D) par addition d'H₂O, ce qui conduit à l'obtention du dérivé de formule (II) suivante, correspondant à un dérivé de formule (II) décrite ci-dessus, dans laquelle R₁ à R₅, R₇ à R₁₀, et X sont tels que définis dans la formule (I), et Y représente -NH₂.



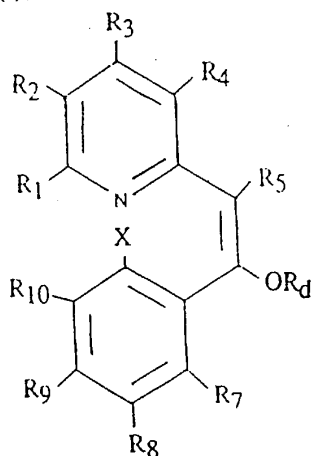
- le cas échéant, traitement du composé de formule (II) susmentionnée, par un dérivé comportant les groupes R_e et R_f tels que définis dans la formule (I), ce dérivé étant susceptible de réagir avec l'atome d'azote lié au carbone en position 6 du composé de formule (II) susmentionnée, notamment par un halogénure de R_e et/ou de R_f tout en ayant, si nécessaire, pris soin de protéger au préalable celles des autres fonctions présentes sur le composé de formule (II) susmentionnée et susceptibles de réagir avec le dérivé comportant les groupes R_e et R_f susmentionnés, ce qui conduit à l'obtention du composé de formule (II) suivante dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis ci-dessus, et Y représente un groupe $-NR_eR_f$ tel que défini dans la formule (I),



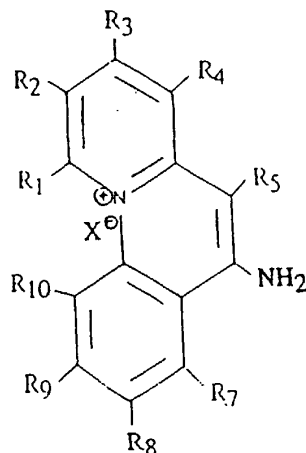
- le cas échéant, hydrolyse, notamment par action de l'acide sulfurique (pH_3) à $40^\circ C$, du composé de formule (II) susmentionnée dans laquelle Y représente NH_2 , ce qui conduit à l'obtention du composé de formule (II) suivante, correspondant à un dérivé de formule (II) décrite ci-dessus, dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis dans la formule (I), et Y représente un groupe $-OH$,

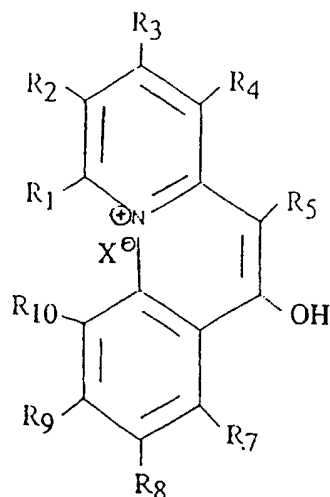


- le cas échéant, traitement du composé de formule (II) susmentionnée, dans laquelle Y représente un groupe -OH, par un dérivé comportant le groupe R_d , tel que défini dans la formule (I), ce dérivé étant susceptible de réagir avec l'atome d'oxygène lié au carbone en position 7 du composé de formule (II) susmentionnée, notamment par un halogénure de R_d , tout en ayant, si nécessaire, pris soin de protéger au préalable celles des autres fonctions présentes sur le composé de formule (II) susmentionnée et susceptibles de réagir avec le dérivé comportant le groupe R_d susmentionné, ce qui conduit à l'obtention du composé de formule (II) suivante dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis ci-dessus, et Y représente un groupe -OR_d tel que défini dans la formule (I),

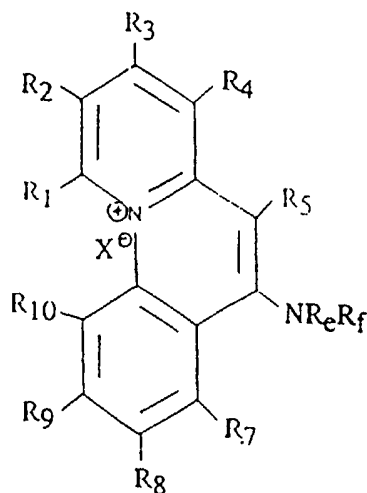


- le cas échéant, chauffage, avantageusement à 200°C, des composés de formule (II) susmentionnée dans laquelle Y représente -NH₂ ou -OH, ce qui conduit respectivement aux composés de formules (III) suivantes, correspondant aux composés de formule (III) décrite ci-dessus, dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis dans la formule (I), et Y représente un groupe -NH₂ ou -OH,

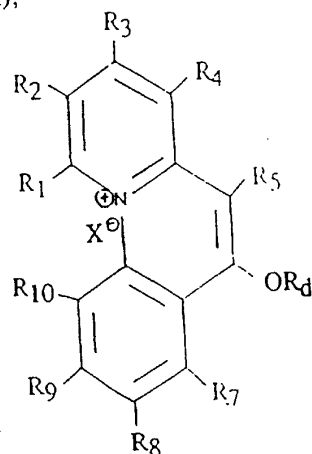




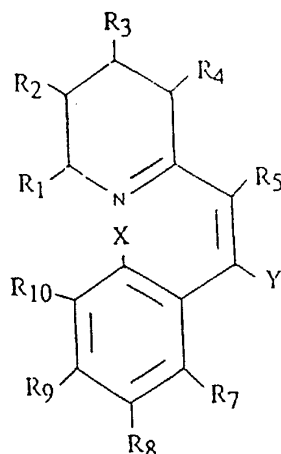
- le cas échéant, traitement du composé de formule (III) susmentionnée, dans laquelle Y représente un groupe -NH_2 , par un dérivé comportant les groupes R_e et R_f tels que définis dans la formule (I), ce dérivé étant susceptible de réagir avec l'atome d'azote lié au carbone en position 6 du composé de formule (III) susmentionnée, notamment par un halogénure de R_e et/ou de R_f , tout en ayant, si nécessaire, pris soin de protéger au préalable celles des autres fonctions présentes sur le composé de formule (III) susmentionnée et susceptibles de réagir avec le dérivé comportant les groupes R_e et R_f susmentionnés, ce qui conduit à l'obtention du composé de formule (III) suivante dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis ci-dessus, et Y représente un groupe $\text{-NR}_e\text{R}_f$ tel que défini dans la formule (I),

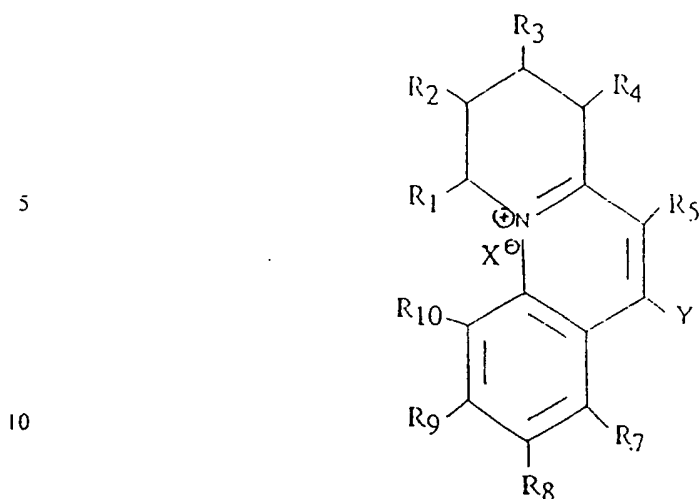


- le cas échéant, traitement du composé de formule (III) susmentionnée, dans laquelle Y représente un groupe -OH, par un dérivé comportant le groupe R_d , tel que défini dans la formule (I), ce dérivé étant susceptible de réagir avec l'atome d'oxygène lié au carbone en position 7 du composé de formule (III) susmentionnée, notamment par un halogénure de R_d , tout en ayant, si nécessaire, pris soin de protéger au préalable celles des autres fonctions présentes sur le composé de formule (III) susmentionnée et susceptibles de réagir avec le dérivé comportant le groupe R_d susmentionné, ce qui conduit à l'obtention du composé de formule (III) suivante dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis ci-dessus, et Y représente un groupe $-OR_d$ tel que défini dans la formule (I),



- le cas échéant, hydrogénation des composés de formules (II) ou (III) susmentionnées, notamment par hydrogénation catalytique en présence d'oxyde de platine à pression réduite, ce qui conduit à l'obtention des composés de formules (II) ou (III) suivantes :





dans lesquelles R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , X et Y sont tels que définis ci-dessus.

15 Les composés A à L décrits ci-dessus sont avantageusement obtenus par traitement de l'harmaline par du butyl lithium (Buli, 2 éq) à -40°C , puis addition de 2-chlorobenzonitrile (le cas échéant substitué par un ou plusieurs des groupes R_7 , R_8 , R_9 et R_{10} tels que définis ci-dessus), ce qui conduit à l'obtention des composés de formule A à F qui, par chauffage à 195°C sous azote, conduisent respectivement aux composés G à L.

20 L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit des procédés de préparation des composés 1 à 24 décrits ci-dessus, ainsi que de l'étude des effets de certains de ces composés sur le CFTR.

25 I- Procédés de préparation des composés 1 à 24 :

a) 1-hydroxy,1-phényl,2-(2-pyridyl)éthylène (composé 1)

Le composé 1 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-après dans le cadre de la préparation du composé 2, mais avec utilisation de benzonitrile au lieu du 2-chlorobenzonitrile.

b) 1-hydroxy,1-(2-chlorophényl),2-(2-pyridyl)éthylène (composé 2)

35 Dans un réacteur de 500 ml, muni d'un réfrigérant à reflux avec une garde à chlorure de calcium, et d'une arrivée d'azote, on place 2,22 g (0,022 mole) de diisopropylamine dans 30 ml de THF anhydre. On amène la solution à 0°C puis on ajoute 13,75 ml de BuLi en solution à 1,6 M dans l'hexane (0,022 mole). On agite 30 minutes à 0°C puis on abaisse la température à -40°C , puis on

additionne 1,86 g (0,02 mole) de 2-méthylpyridrine. On agite 30 minutes à -40°C, puis on ajoute 2,75 g de 2-chlorobenzonitrile dans 20 ml de THF anhydre. On laisse le milieu réactionnel revenir à la température ambiante et on ajoute 20 ml d'eau, puis on ajuste le pH vers 2 par addition d'H₂SO₄ 2N. On chauffe à reflux et sous agitation pendant 1 heure. On extrait par le chloroforme, on sèche sur sulfate de sodium. Le solvant est évaporé et le résidu est dissout dans le minimum d'éther anhydre, puis on ajoute goutte à goutte de l'éthanol saturé d'HCl jusqu'à complète précipitation du chlorhydrate. On obtient ainsi 2,99 g du composé 2 soit un rendement de 56%

- Point de fusion (Pf) = 190 °C

- Analyse élémentaire : C₁₃ H₁₁ Cl N₂ O

Calculé % C : 58,20 H : 4,10 N : 5,20

Trouvé % C : 58,00 H : 4,10 N : 5,30

c) 1-amino,1-(2-chlorophényl),2-(2-pyridyl)éthylène (composé 3)

Le composé 3 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 2, mais sans l'étape d'hydrolyse par addition d'H₂SO₄.

d) 1-hydroxy,1-(2-bromophényl) 2-(2-pyridyl)éthylène (composé 4)

Le composé 4 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 2, mais avec utilisation de 2-bromobenzonitrile au lieu du 2-chlorobenzonitrile.

e) 1-hydroxy 1-(2,3-dichlorophényl),2-(2-pyridyl)éthylène (composé 5)

Dans un réacteur de 500 ml, muni d'un réfrigérant à reflux avec une garde à chlorure de calcium, et d'une arrivée d'azote, on place 2,22 g (0,022 mole) de diisopropylamine dans 30 ml de THF anhydre. On amène la solution à 0°C puis on ajoute 13,75 ml de BuLi en solution à 1,6 M dans l'hexane (0,022 mole). On agite 30 minutes à 0°C, puis on abaisse la température à -40°C, puis on additionne 1,86 g (0,02 mole) de 2-méthylpyridrine. On agite 30 minutes à -40°C, puis on ajoute 2,58 g (0,015 mole) de 2,3-dichlorobenzonitrile dans 20 ml de THF anhydre. On laisse le milieu réactionnel revenir à la température ambiante et on ajoute 20 ml d'eau puis on ajuste le pH vers 2 par addition d'H₂SO₄ 2N. On chauffe à reflux et sous agitation pendant 2 heures. On sépare la phase organique, on sèche sur sulfate de sodium. Le solvant est évaporé et le

résidu est chromatographié sur colonne de silice en éluant au chloroforme pour obtenir 3,19 g (80 %) de cétone pure.

- Point de fusion (Pf) = 112°C

- Analyse élémentaire : C₁₃ H₉ N O Cl₂

5 Calculé % C : 58,67 H : 3,41 N : 5,26

Trouvé % C : 58,53 H : 3,63 N : 5,34

- Spectre de ¹H RMN (CDCl₃) (δ ppm, signal, N protons, attribution) :

8, doublet, H en 6 pyridine ; 7,6,5, multiplet, 6, H aromatiques.

5,55, s, 1 (80%) H vinylique ; 4,25, s s2 (20 %) CH₂.

10

La base ainsi obtenue peut-être transformée en chlorhydrate : on dissout la base dans l'éther anhydre et on ajoute goutte à goutte de l'éthanol anhydre saturé d'HCl.

- Analyse élémentaire : C₁₃ H₁₀ N O Cl₃ :

15 Calculé % C : 51,60 H : 3,33 N : 4,63

Trouvé % C : 51,75 H : 3,52 N : 4,58

f) 1-hydroxy,1-(2,4-dichlorophényl),2-(2-pyridyl)éthylène (composé 6)

20 Le composé 6 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 2, mais avec utilisation de 2-4-dichlorobenzonitrile au lieu du 2-chlorobenzonitrile.

g) 1-hydroxy,1-(2,5-dichlorophényl),2-(2-pyridyl)éthylène (composé 7)

25 Le composé 7 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 2, mais avec utilisation de 2-5-dichlorobenzonitrile au lieu du 2-chlorobenzonitrile.

h) 1-hydroxy,1-(2,6-dichlorophényl),2-(2-pyridyl)éthylène (composé 8)

30 Le composé 8 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 2, mais avec utilisation de 2-6-dichlorobenzonitrile au lieu du 2-chlorobenzonitrile.

i) 1-hydroxy,1-(2-chlorophényl),2-(2-quinonyl) éthylène (composé 9)

35 Le composé 9 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 2, mais avec utilisation du 2-méthylquinoléine au lieu du 2-méthylpyridine.

j) 1-amino,1-(2-chlorophényl),2-(2-quinolyl)éthylène (composé 10)

Le composé 10 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 9, mais sans l'étape d'hydrolyse par addition d' H_2SO_4 .

k) Chlorure de 6-aminobenzo[c]quinolizium MPB-26 (composé 11)

Dans un réacteur de 500 ml, muni d'un réfrigérant à reflux avec une garde à chlorure de calcium, et d'une arrivée d'azote, on place 2,22 g (0,022 mole) de diisopropylamine dans 30 ml de THF anhydre. On amène la solution à 0°C , puis on ajoute 13,75 ml de BuLi en solution à 1,6 M dans l'hexane (0,022 mole). On agite 30 minutes à 0°C , puis on abaisse la température à -40°C , puis on additionne 1,86 g (0,02 mole) de 2-méthylpyridine. On agite 30 minutes à -40°C , puis on ajoute 2,75 g de 2-chlorobenzonitrile (0,02 mole) dans 20 ml de THF anhydre. On laisse le milieu réactionnel revenir à la température ambiante et on ajoute une solution à 10% de chlorure d'ammonium. La phase organique est séparée, on sèche sur SO_4Na_2 , on évapore et le résidu est porté à 200°C sous un courant d'azote pendant 15 minutes. On observe un dégagement de vapeurs blanches et la prise en une masse brunâtre du résidu. Le produit est purifié par un premier lavage à l'acétone puis dissolution dans l'éthanol et précipité par l'acétate d'éthyle. On peut aussi purifier par chromatographie sur colonne d'alumine neutre et élution par l'acétate d'éthyle. On obtient ainsi 1,73 g (35%) d'un produit cristallisant avec une molécule d'eau.

- Point de fusion (Pf) = décomposition vers 280°C

- Analyse élémentaire : $\text{C}_{13} \text{H}_{13} \text{Cl} \text{N}_2 \text{O}$ ($\text{C}_{13} \text{H}_{11} \text{Cl} \text{N}_2, \text{H}_2\text{O}$)

Calculé % C : 62,78 H : 5,27 N : 11,26

Trouvé % C : 62,86 H : 5,03 N : 11,25

- Spectre de masse : m/e 194 ($\text{M}^+ - \text{HCl} - \text{H}_2\text{O}$).

- Spectre infrarouge (KBr) ($\nu \text{ cm}^{-1}$, attribution) : 3460, 3360, NH_2 ; 1660, 1640, 1600, $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$; 760 benzène orthosubstitué.

- Spectre de ^1H RMN (DMSO-d_6) (δ ppm, signal, n protons, attribution): 3,2 à 4, pic échangeable D_2O ($\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O}$); 7,1 singulet, H en 5; 7,4 à 8,15, 2 massifs, 5H aromatiques; 9,00, 2H, aromatiques; 9,8, doublet $J=8$ Hz, H en 1.

l) Chlorure de 6-hydroxybenzo[c]quinolizinium MPB-05 (composé 12)

Le 1-hydroxy,1-(2-chlorophényl),2-(2-pyridyl)éthylène (composé 2) est neutralisé par une solution aqueuse de carbonate de sodium, la base est extraite par l'éther, la solution est séchée sur SO_4Na_2 puis le solvant évaporé. 1,16 g (0,005 mole) de base sous forme d'huile jaune pâle est chauffée sous azote à 195°C pendant 15 minutes. Le résidu ainsi obtenu, est lavé à l'acétone, puis dissout dans l'éthanol et précipité par addition d'acétate d'éthyle. On obtient 0,75 g (60%) d'un produit cristallisé avec une molécule d'eau de couleur blanc crème.

- Point de fusion (Pf) = 256°C (décomposition)

- Analyse élémentaire : $\text{C}_{13} \text{H}_{10} \text{Cl N O}$, H_2O soit $\text{C}_{13} \text{H}_{12} \text{Cl N O}$ ($M=231,5 + 18=249,5$)

Calculé % C : 62,53 H : 4,85 N : 5,61

Trouvé % C : 62,40 H : 5,00 N : 5,80

- Spectre de masse : m/e 195 ($M^+ - \text{HCl} - \text{H}_2\text{O}$), 167 ($M^+ - \text{HCl} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}$).

- Spectre infrarouge (KBr) ($\nu \text{ cm}^{-1}$, attribution) : 3250, OH; 1640, C=N, 770, benzène orthosubstitué.

- Spectre de ^1H RMN (DMSO-d_6) (δ ppm, signal, n protons, attribution): 6,60, pic large échangeable D_2O , HO; 7,75, singulet, H en 5 ; 7,9 à 8,6, multiplet, 6H, aromatiques; 9,15, doublet, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 1H ; 10, doublet, $J = 6\text{Hz}$, H en 1.

m) Bromure de 6-aminobenzo[c]quinolizinium MPB-01 (composé 13) :

Le composé 13 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 11, mais avec utilisation du 2-bromobenzonitrile au lieu du 2-chlorobenzonitrile.

n) Chlorure de 6-amino,10-chlorobenzo[c]quinolizinium MPB-02 (composé 14) :

Le composé 14 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 11, mais avec utilisation du 2,3-dichlorobenzonitrile au lieu du 2-chlorobenzonitrile.

o) Chlorure de 6-amino,9-chlorobenzo[c]quinolizinium (composé 15) :

Le composé 15 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 11, mais avec utilisation du 2,4-dichlorobenzonitrile au lieu du 2-chlorobenzonitrile.

p) Chlorure de 6-amino,7-chlorobenzo[c]quinolizinium (composé 16) :

Le composé 16 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 11, mais avec utilisation du 2,6-dichlorobenzonitrile au lieu du 2-chlorobenzonitrile.

q) Chlorure de 6-amino,8-chlorobenzo[c]quinolizinium (composé 17) :

Le composé 17 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 11, mais avec utilisation du 2,5-dichlorobenzonitrile au lieu du 2-chlorobenzonitrile.

r) Bromure de 6-hydroxybenzo[c]quinolizinium MPB-06 (composé 18) :

Le composé 18 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-après dans le cadre de la préparation du composé 19, mais effectué à partir du composé 4 au lieu du composé 5.

s) Chlorure de 6-hydroxy,10-chlorobenzo[c]quinolizinium MPB-07 (composé 19) :

Le 1-hydroxy,1-(2-bromophényl),2-(2-pyridyl)éthylène (composé 5) 1.40 g (0,0053 mole) est chauffée sous azote à 215°C. Vers 190°C, on note l'apparition de fumées blanches de HCl et on poursuit le chauffage pendant 10 minutes à 220°C. Le produit est lavé au chloroforme puis le résidu (1,82 g) est purifié par chromatographie sur colonne de silice en éluant par l'acétate et l'alcool. On obtient ainsi 0,58 g (42 %) de produit.

- Pf = 196 °C (décomposition)

- Analyse élémentaire : $C_{13}H_{10}NOCl_2$

Calculé % C : 56,75 H : 3,66 N : 4,63

Trouvé % C : 56,25 H : 3,31 N : 4,78

t) Chlorure de 6-hydroxy,9-chlorobenzo[c]quinolizinium MPB-08 (composé 20) :

Le composé 20 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 19, mais effectué à partir du composé 6 au lieu du composé 5.

u) Chlorure de 6-hydroxy,7-chlorobenzo[c]quinolizinium (composé 21) :

Le composé 21 est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé 19, mais effectué à partir du composé 8 au lieu du composé 5.

v) Perchlorate de 8-aminodibenzo[c,f]quinolizinium (composé 22) :

Dans un réacteur de 500 ml, muni d'un réfrigérant à reflux avec une garde à chlorure de calcium, et d'une arrivée d'azote, on place 2,22 g (0,022 mole) de diisopropylamine dans 30 ml de THF anhydre. On amène la solution à 0°C, puis on ajoute 13,75 ml de BuLi en solution à 1,6 M dans l'hexane (0,022 mole). On agite 30 minutes à 0°C, puis on abaisse la température à -40°C, puis on additionne 2,86 g (0,02 mole) de quinaldine. On agite 30 minutes à -40°C, puis on ajoute 2,75 g de 2-chlorobenzonitrile (0,02 mole) dans 20 ml de THF anhydre. On laisse le milieu réactionnel revenir à la température ambiante et on ajoute une solution à 10% de chlorure d'ammonium. La phase organique est séparée, on sèche sur SO_4Na_2 , on évapore et le résidu est porté à 230°C sous un courant d'azote pendant 30 minutes. On observe un dégagement de vapeurs blanches d'acide chlorhydrique et la prise en une masse brunâtre du résidu. Le produit est purifié par un premier lavage à l'acétone puis dissolution dans l'éthanol et précipité par l'acétate d'éthyle. Le produit est dissout dans un minimum d'eau et on ajoute une solution d'acide perchlorique jusqu'à fin de précipitation. Le composé est filtré pour recueillir 2,20 g (32%).

- Analyse élémentaire : $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_4$

Calculé % C : 59,22 H : 3,80 N : 8,13

Trouvé % C : 59,39 H : 3,95 N : 8,26

- Spectre infrarouge (KBr) ($\nu\text{ cm}^{-1}$, attribution) : 3400, 3280, NH_2 ; 1650, 1600, 1000, bande large, ClO_4 .

- Spectre de ^1H RMN (DMSO-d_6) (δ ppm, signal, n protons, attribution) : 7,0, singulet, 1H en 5 ; 7,5 à 8,7, multiplet, 10H aromatiques ; 9,0 singulet, 2H, échangeables D_2O .

w) Chlorure de 6-acétamidobenzo[c]quinolizinium (composé 23) :

On dissout 1 g (0,004 mole) de chlorhydrate de 6-aminobenzo[c]quinolizinium dans 10 ml d'acide acétique, puis on ajoute 25 ml d'anhydride acétique. On porte à reflux pendant 24 heures, puis on évapore l'anhydride et l'acide acétique sous pression réduite.

Le produit obtenu de couleur violette est lavé à l'acétate d'éthyle, puis recristallisé dans l'éthanol. On obtient 0,93 g (85 %) d'un produit blanc crème.

- Pf = > à 280°C

- Analyse élémentaire : C₁₅ H₁₃ Cl N₂ O

Calculé % C : 66,05 H : 4,80 N : 10,27

Trouvé % C : 65,85 H : 5,01 N : 10,31

- Spectre infrarouge (KBr) (ν cm⁻¹, attribution) : 3450, NH; 1700, C = O.

x) Perchlorate de 1,2,3,4-tétrahydro,6-aminobenzo[c,f]quinolizinium
(composé 24) :

Le chlorhydrate de 6-aminobenzo[c]quinolizinium 0,50 g (0,002 mole) est dissous dans 20 ml d'éthanol, et est mis en présence d'oxyde de platine et d'hydrogène à pression atmosphérique. L'hydrogénation est réalisée en quelques minutes puis la solution est filtrée, l'alcool évaporé et le résidu repris par 10 ml d'eau distillée et on ajoute une solution d'acide perchlorique à 25% tant que le précipité se forme. Le produit blanc est recristallisé dans le méthanol pour donner 0,54 g (91%) de perchlorate.

- Pf = 240°C

- Analyse élémentaire : C₁₃ H₁₅ Cl N₂ O₄

Calculé % : C : 52,27 H : 5,06 N : 9,38

Trouvé % : C : 52,30 H : 5,16 N : 9,46

- Spectre infrarouge (KBr) (ν cm⁻¹, attribution) : 3460, 3360, NH₂; 1650, 1600, 1100, bande large, ClO₄.

- Spectre de ¹H RMN (DMSO-d₆) (δ ppm, signal, n protons, attribution) :
2,1, multiplet, CH₂ en 2 et 3; 3,20, triplet, CH₂ en 4; 4,45, triplet, CH₂ en 1,;
6,60, singulet, H en 5; 7,6 à 8,4, multiplet, 4H, aromatiques; 8,6 singulet, 2H, échangeables D₂O.

II- Procédé de préparation des composés A à F :

a) 1-amino 1-(2,6-dichlorophényl) 2-[1-(3,4-dihydropyrido[3-4-b]indolyl)]
éthylène (composé A)

Dans un réacteur muni d'une arrivée d'azote, 1,84 g (0,01 mole) d'harmaline sont mis en solution dans 40 ml de THF et sont amenés à -40°C. On ajoute goutte à goutte 13,75 ml (0,022 mole) de BuLi, une coloration rouge foncée apparaît, la solution est laissée sous agitation pendant 30 min. Le 2,6-dichlorobenzonitrile 1,71 g (0,01 mole) est mis en solution dans 15 ml de THF

puis ajouté goutte à goutte. Après 1 h à -40°C, le mélange est agité 4 h à température du laboratoire. L'évolution de la réaction est suivie sur CCM, la disparition des produits de départ est corrélée à l'apparition d'une tache fluorescente jaune caractéristique de l'imine. L'hydrolyse par 5 ml d'une solution de NH₄Cl à 10 % permet de recueillir la phase THF contenant l'imine. Cette phase est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée à sec. Le produit est purifié par chromatographie colonne sur gel de silice, élution par un mélange CH₂Cl₂/CH₃COOC₂H₅ 5 %. On obtient ainsi 2,06 g du composé A, soit un rendement de 58 %.

- Pf = 228°C

- Analyse élémentaire : C₁₉ H₁₅ N₃ Cl₂

Calculé % C : 64,06 H : 4,24 N : 11,79

Trouvé % C : 64,21 H : 4,37 N : 11,62

- Spectre infrarouge (KBr) (ν cm⁻¹, attribution) :

3428, 3255, 3134 cm⁻¹, NH; NH₂

3134 cm⁻¹, C=C-H

2932, 2843 cm⁻¹, CH₂

- Spectre ¹H RMN (CDCl₃) (δ ppm, signal, n protons, attribution) :

8.40 singulet échangeable par D₂O, 3 H, NH et NH₂

7.20, multiplet, 7 H, protons aromatiques

5.00, singulet, 1 H, H vinylique

3.70, triplet, J=6Hz, 2 H, CH₂

3.00, triplet, J=6Hz, 2 H, CH₂

25

b) 1-amino 1-(o-chlorophényl) 2-[1-(3,4-dihydropyrido [3-4-b]indolyl)]
éthylène (composé B)

Le composé B est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé A mais avec l'utilisation de l'orthochlorobenzonitrile au lieu du 2,6 dichlorobenzonitrile.

30

c) 1-amino 1-(2,5-dichlorophényl) 2-[1-(3,4-dihydropyrido [3-4-b]indolyl)]
éthylène (composé C)

Le composé C est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé A mais avec l'utilisation du 2,5 dichlorobenzonitrile au lieu du 2,6 dichlorobenzonitrile.

35

d) 1-amino 1-(2,4-dichlorophényl) 2-[1-(3,4-dihydropyrido [3-4-b]indolyl)]
éthylène (composé D)

Le composé D est préparé selon un mode opératoire identique à celui
5 décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé A mais avec
l'utilisation du 2,4 dichlorobenzonitrile au lieu du 2,6 dichlorobenzonitrile.

e) 1-amino 1-(2,3-dichlorophényl) 2-[1-(3,4-dihydropyrido [3-4-b]indolyl)]
éthylène (composé E)

10 Le composé E est préparé selon un mode opératoire identique à celui
décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé A mais avec
l'utilisation du 2,3 dichlorobenzonitrile au lieu du 2,6 dichlorobenzonitrile.

f) 1-amino 1-(4-bromo,2-chlorophényl) 2-[1-(3,4-dihydropyrido [3-4-b]indolyl)]
éthylène (composé F)

15 Le composé F est préparé selon un mode opératoire identique à celui
décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé A mais avec
l'utilisation du 2-chloro-4 bromobenzonitrile au lieu du 2,6 dichlorobenzonitrile.

20 III- Procédé de fabrication des composés G à L :

Cyclisation des composés A à F en quinolizinium G à L.

a) Chlorure de 14-amino 6,7-dihydro 12H-1-chloro benzo-[n] indolo[2,3-
a] quinolizinium (composé G).

25 L'énamine A purifiée est chauffée sous azote ; vers 150°C le produit se
liquéfie, puis à 195°C des fumées blanches apparaissent et le produit se prend
en masse. Le chauffage est maintenu à cette température pendant 10 min. On
observe en CCM la disparition de la tache fluorescente jaune de l'imine d'un Rf
de 0,3 sur silice dans CH₂Cl₂ et l'apparition d'une tache fluorescente jaune-vert
30 du produit cyclisé d'un Rf de 0,1 sur alumine dans l'alcool. Le produit est
purifié par lavage à l'acétone, puis recristallisation dans l'alcool ou par
chromatographie : alumine - alcool.

Le produit ainsi obtenu est de couleur marron clair, avec un rendement de 17 %.

- Pf = 228°C.

35 - Analyse élémentaire : C₁₉ H₁₅ N₃ Cl₂, 1/2 H₂O

Calculé % C : 62,48 H : 4,41 N : 11,50

Trouvé % C : 62,29 H : 4,47 N : 11,43

- Spectre ^1H RMN ($\text{CF}_3\text{ COOD}$) (δ ppm, signal, n protons, attribution) :
8.10 - 6.20, massif, 11 H, protons aromatiques + NH + NH_2

3.90, triplet mal résolu, 2 H, CH_2 en 6

3.00, triplet mal résolu, 2 H, CH_2 en 7

5 - Spectres infrarouge (KBr) ($\nu\text{ cm}^{-1}$, attribution) présentent tous les mêmes absorptions :

3458, 3371 cm^{-1} , NH; NH_2

3073 cm^{-1} , C=C-H

1638 cm^{-1} , C=N, C=C

10

b) Chlorure de 14-amino 6,7-dihydro 12H-benzo-[f] indolo[2,3-a] quinolizinium (composé H).

Le composé H est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé G mais avec
15 l'utilisation du composé B au lieu du composé A.

Le produit obtenu est de couleur jaune moutarde avec un rendement de 56 %.

- Pf supérieur à 260°C.

- Analyse élémentaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{Cl}$

Calculé % C : 70,91 H : 5,01 N : 13,06

20 Trouvé % C : 70,33 H : 5,06 N : 12,71

c) Chlorure de 14-amino 6,7-dihydro 12H-2-chloro benzo-[1] indolo[2,3-a] quinolizinium (composé I).

Le composé I est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit
25 ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé G mais avec l'utilisation du composé C au lieu du composé A.

Le produit obtenu est de couleur marron clair avec un rendement de 7 %.

- Pf supérieur à 260°C.

- Analyse élémentaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$

30 Calculé % C : 60,97 H : 4,38 N : 11,22

Trouvé % C : 61,32 H : 5,03 N : 10,52

d) Chlorure de 14-amino 6,7-dihydro 12H-3-chloro benzo-[1] indolo[2,3-a] quinolizinium (composé J).

35 Le composé J est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé G mais avec l'utilisation du composé D au lieu du composé A.

Le produit obtenu est de couleur marron clair avec un rendement de 52 %.

- Pf supérieur à 260°C.

- Analyse élémentaire : $C_{19}H_{15}N_3Cl_2$

Calculé % C : 64,06 H : 4,24 N : 11,79

Trouvé % C : 63,89 H : 4,48 N : 11,58

e) Chlorure de 14-amino 6,7-dihydro 12H-4-chloro benzo-[1] indolo[2,3-a] quinolizinium (composé K).

Le composé K est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé G mais avec l'utilisation du composé E au lieu du composé A.

Le produit obtenu est de couleur marron clair avec un rendement de 6 %.

- Pf supérieur à 260°C.

- Analyse élémentaire : $C_{19}H_{15}N_3Cl_2 \cdot H_2O$

Calculé % C : 60,97 H : 4,58 N : 11,22

Trouvé % C : 60,56 H : 4,66 N : 10,84

f) Chlorure de 14-amino 6,7-dihydro 12H-3-bromo benzo-[1] indolo[2,3-a] quinolizinium (composé L).

Le composé L est préparé selon un mode opératoire identique à celui décrit ci-dessus dans le cadre de la préparation du composé G mais avec l'utilisation du composé F au lieu du composé A.

Le produit obtenu est de couleur jaune moutarde avec un rendement de 12 %.

- Pf supérieur à 260°C.

- Analyse élémentaire : $C_{19}H_{15}N_3Cl, Br, 2H_2O$

Calculé % C : 52,25 H : 4,38 N : 9,62

Trouvé % C : 52,28 H : 4,36 N : 9,66

IV- Etude des effets des composés de l'invention sur le CFTR :

A) Méthodologie

a) Culture des cellules épithéliales humaines et des cellules recombinantes

CHO :

Plusieurs types cellulaires sont utilisés pour cette étude : les lignées intestinales T84, Caco-2 et HT 29. Des cellules Chinese-Hamster-Ovary (CHO-

K1) ont été transfectées à l'aide du vecteur pNUT (Tabcharani et al., 1991) incorporant ou non (cellules contrôles) l'ADNc CFTR normal ou muté (Chang et al., 1993). Les cellules sont maintenues dans ce milieu spécifique puis ensemencées à faible densité sur lamelles de verres et cultivées à 37°C (5% CO₂) avant les expériences de patch-clamp. Le milieu de survie des cellules est composé de α MEM avec du sérum de boeuf foetal (7%) et des antibiotiques : antibiotiques : 50 IU/ml pénicilline et 50 μ g/ml streptomycine et méthotrexate (100 μ M à 200 μ M).

b) Principes de la technique d'électrophysiologie moléculaire ou patch-clamp :

L'activité électrique des cellules est contrôlée par la présence et le fonctionnement de pores transmembranaires, les canaux ioniques. Les canaux ioniques sont des protéines dont l'état conformationnel peut être modifié en réponse à différents facteurs : le champ électrique transmembranaire, la fixation de ligands ou des réactions biochimiques post-transcriptionnelles. Le courant traversant un canal ionique est de l'ordre du milliardième d'Ampère (pico Ampère, 1 pA = 10^{-12} A). Il peut être mesuré par les techniques d'électrophysiologie moléculaire plus communément nommées patch-clamp.

Avec les techniques classiques de mesure des courants transmembranaires par des microélectrodes intracellulaires, le bruit de fond thermodynamique est au moins cent fois supérieur au courant traversant un seul canal ionique. Dans de telles conditions, le flux dans un canal est masqué par ce bruit dont la variance croît avec le courant moyen. Erwin Neher et Bert Sackman (voir Hamill et al., 1981) du Max Planck Institut de Göttingen ont montré que l'on pouvait par l'analyse du bruit estimer le courant passant dans un canal ionique. Le bruit de fond thermodynamique est proportionnel à la surface de la membrane. Ainsi, en limitant celle-ci, le bruit de fond devient inférieur au courant traversant le canal.

La technique du patch-clamp découle de l'observation faite par ces deux chercheurs et leurs collaborateurs : une micropipette de verre appliquée sur une surface membranaire y adhère de telle sorte que la résistance électrique établie entre la pipette et la membrane atteint la valeur du gigaohm (1 Gohm = 10^9 ohm). La loi d'ohm donne la résistance électrique (R) par rapport à l'intensité du courant I (en Ampère) et le potentiel U (en Volt) imposé (équation 1) et permet de déterminer la conductance (unité : le picoSiemens, ps) unitaire du canal g (équation 2).

(équation 1) $U = R.I$

(équation 2) $g = 1/R$

5 Les forces d'interaction entre le verre de la pipette et les phospholipides de la membrane permettent de réduire les courants de fuite, étape indispensable pour la mesure du courant traversant un canal ionique. La configuration obtenue ainsi est désignée par le terme de "cell-attached" ou cellule attachée. En retirant la pipette à partir de la configuration cellule attachée, on arrache un fragment
10 (patch) de membrane qui reste fixée à l'extrémité de la pipette. La configuration ainsi obtenue est dite "inside-out" car la face intracellulaire de la membrane se retrouve dans le bain. La face extracellulaire de la membrane est en contact avec la solution contenue dans la pipette alors que la partie intracellulaire est en contact avec le milieu de perfusion de la cuve expérimentale. Un montage
15 électronique permet d'imposer (to clamp) une différence de potentiel ($V_{ref} - V_p$) entre l'électrode de référence du bain (V_{ref}) et la pipette (V_p) et de mesurer le courant I résultant. Si la composition ionique est la même de part et d'autre de la membrane (milieux symétriques), l'intensité du courant I est alors directement proportionnelle à la différence de potentiel imposée à la membrane. Les points
20 $I(V)$ se répartissent généralement sur une droite dont la pente et la position définissent la conductance unitaire (g) du canal et le potentiel d'inversion du courant, E_{rev} . Au potentiel d'inversion, le flux de charges à travers la membrane est nul. Le potentiel d'inversion sera défini par l'équation de Nernst (équation 3) ou E représente le potentiel de Nernst pour l'ion considéré et C la
25 concentration de l'ion dans les compartiments extracellulaire (C_o) et intracellulaire (C_i).

(équation 3) $E = RT/zF \log C_o/C_i$

30 En configuration cell-attached, le potentiel de l'électrode s'additionne à celui de la membrane qui est d'environ -60 mV. Dans toutes les cellules, les concentrations en ions potassium (K^+) et chlore (Cl^-) sont respectivement voisines de 150 mM et 10 mM. Avec une pipette contenant 150 mM KCl, les potentiels de Nernst pour les ions K^+ (E_K) et Cl^- (E_{Cl}) seront respectivement
35 proches de zéro et -50 mV. L'inversion du courant chlore sera donc obtenue au voisinage du potentiel de repos, c'est-à-dire sans appliquer de potentiel à la membrane ($V_p = 0$ mV). Par contre, l'inversion d'un courant potassium sera

obtenu en annulant le potentiel de la membrane, donc en la dépolarisant de 50 à 60 mV. Cet exemple illustre les stratégies utilisées pour apprécier la nature ionique d'un canal. Les informations collectées par cette technique sont représentées par la fluctuation d'un courant électrique (de l'ordre de la milliseconde, ms) qui traduit les transitions entre les différents états de conductance du canal.

c) Patch-clamp appliqué à l'étude des cellules épithéliales en culture.

Les expériences de patch-clamp sont effectuées sur des cellules confluentes. Un fragment de la lamelle de verre (support des cellules) est placé dans une cuve d'expérimentation (volume 600 μ l ou 1 ml) sur la platine d'un microscope inversé, équipé avec un éclairage en contraste de phase (Olympus IMT2). Les configurations cell-attached et inside-out sont utilisées (Hamill et al., 1981). Les expériences sont réalisées à température ambiante (20-22°C). Les courants sont amplifiés avec un amplificateur LIST EPC 7 (Darmstadt, Germany) (Filtre de 3 kHz) avec un filtre passe-bas de 2-5 kHz (filtre Bessel à 6 pôles) et enregistrés avec un DAT (Digital Audio Tape) après digitalisation (16 bits) à 44 kHz. Les données sont ensuite transférées sur un ordinateur Olivetti M28PC. La fabrication des pipettes s'effectue à partir de tubes de verre de 1 mm de diamètre (Clark Electromedical Instrument) en deux ou trois étapes avec une étireuse horizontale (type Flaming/Brown, modèle P-87, Sutter Inst. Co. USA). Les pipettes remplies d'une solution de 150 mM NaCl ont une résistance comprise entre 4 et 12 M Ω . Les potentiels sont exprimés comme la différence entre le potentiel de l'électrode de patch et celui du bain. En configuration cell-attached, ils représentent le changement de potentiel par rapport au potentiel de repos de la cellule. Les potentiels de jonction sont évalués par le potentiel de l'électrode correspondant à un courant nul (lorsque les canaux sont fermés). Ils sont minimisés en utilisant un pont d'agar établissant la connexion entre le bain et l'électrode de référence (terre) et contenant la même solution que celle de la pipette. Le potentiel d'inversion du courant et la conductance unitaire des canaux sont obtenus à partir de la relation courant-voltage (I/V) par régression linéaire. Pour déterminer la relation courant-voltage, les amplitudes courants ioniques sont mesurées à partir d'histogrammes d'amplitude. Les histogrammes d'amplitude se présentent comme la somme de deux ou plusieurs distributions Gaussiennes dont les pics correspondent aux états ouverts et fermés des canaux présents dans l'électrode.

A partir de ces histogrammes on peut déterminer : N, le nombre total de canaux présents dans le patch ; n, le nombre de canaux simultanément ouverts ($n=0, 1, 2, \dots, N$); P_o , la probabilité d'ouverture d'un canal; et I, l'intensité moyenne du courant dans un canal. Lorsque les canaux en présence sont de même type et supposés s'ouvrir et se fermer indépendamment les uns des autres, la probabilité d'avoir n canaux ouverts simultanément est donnée par la distribution binomiale (équation 4) d'où l'on déduit la probabilité individuelle P_o (équation 5).

$$(équation 4) \quad P(n) = (N!/n!(N-n)!) P_o^n (1-P_o)^{N-n}$$

$$(équation 5) \quad P_o = P(n)/N$$

L'étude présente ne concernant que des canaux Cl^- , un courant sortant devra être interprété comme un mouvement d'ions Cl^- sortant de la pipette vers le milieu intracellulaire des cellules ou vers le milieu de perfusion. La perméabilité relative P_X/P_{Cl} d'un anion X^- par rapport aux ions Cl^- a été utilisée pour évaluer la sélectivité ionique des canaux en configuration inside-out. L'équation de Goldman-Hodgkin-Katz (équation 6) permet de relier le rapport des perméabilités en fonction du potentiel d'inversion (E_{rev}) obtenu expérimentalement et des concentrations respectives des anions en présence.

$$(équation 6) \quad E_{rev} = -RT/F \ln \left(([Cl^-]_e + P_X/P_{Cl} [X^-]_e) / ([Cl^-]_i + P_X/P_{Cl} [X^-]_i) \right)$$

i et e : concentration ionique intracellulaire et extracellulaire, R, T et F ont leur signification habituelle.

Pour le remplissage des électrodes de patch, la composition des solutions salines est (en mM) : 150 NaCl, 2 $MgCl_2$, 10 TES (pH 7,4). Le bain de perfusion des cellules contient (en mM) : 145 NaCl, 4 KCl, 2 $MgCl_2$, 0,5 $CaCl_2$, 10 TES (pH 7,4).

d) Mesure des courants de court-circuit en chambre de Ussing.

L'intérêt de la culture des épithéliums dans des chambres à fond perméable et notamment des épithéliums digestifs (lignée HT 29 et ses différents clones, lignée T84 ou Caco2) a été largement démontré lors d'études de biologie cellulaire. Dans cette technique, les cellules sont mises en culture à l'intérieur d'une cupule où le fond est constitué d'une membrane de polystyrène percée de

trous dont le diamètre (entre 0,45 et 3 μm) et la répartition sont soigneusement mesurés. Elle permet l'attachement des cellules sans ajouter de matrice supplémentaire. Elle est transparente dans un milieu dont l'indice de réfraction est voisin de celui de l'eau et permet l'examen optique de la couche cellulaire.

5 Cependant des limitations existent. Bien que la faible épaisseur de la membrane limite la rétention des fluides, on ne peut exclure qu'elle puisse constituer un piège pour des macromolécules ou des complexes comme les gélosomes. Cette cupule de 5 cm^2 de surface est placée dans une plaque à 6 puits. L'attachement et la culture des cellules y sont conduits de manière traditionnelle. Une

10 quinzaine de jours après l'ensemencement les cellules forment une monocouche étanche. Cette étanchéité est avérée par l'apparition d'une résistance électrique ou par la non diffusion de macromolécules entre les deux compartiments muqueux et séreux. La culture est stable une dizaine de jours en maintenant un milieu de culture identique dans les deux compartiments. Cette culture des

15 épithéliums dans des chambres à fond perméable est tout à fait utile pour étudier la nature et la régulation des sécrétions et des passages de molécules chargées ou non chargées à travers l'épithélium. Le transport transépithélial va dépendre de la nature des perméases présentes dans les deux domaines apicaux ou basolatéraux, de part et d'autre de la jonction serrée. Les propriétés de

20 l'épithélium qui se traduisent par un passage de molécules chargées, peuvent être facilement déduites de la mesure du potentiel transépithélial ou du courant de court-circuit. Quand les molécules sont neutres on utilise des molécules marquées pour suivre leurs mouvements.

25 e) Principes de la méthode de mesure.

Schématiquement le transport transépithélial est le bilan du transport cellulaire et de la diffusion sélective à travers la jonction. Le transport cellulaire résulte de l'activité de couples de perméases spécifiques situées respectivement

30 sur le pôle apical et sur le pôle basal de la cellule (canal Na^+ et Na^+/K^+ ATPase, canal Cl^- et cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, cotransporteur $\text{Na}/\text{glucose}$ et transporteur diffusionnel du glucose ...). Quand l'épithélium transporteur est étanche la jonction serrée isole deux parties de la membrane qui ont un potentiel différent par rapport au milieu. On peut utiliser une analogie électrique simple et

35 les considérer comme des éléments de circuit ayant respectivement les potentiels V_m (muqueux) et V_s (séreux). Ces deux membranes en série ont donc un potentiel V_t qui est la somme algébrique $V_m + V_s$. Dans le tissu utilisé V_t peut

atteindre -5 mV dans les conditions standards. Pour déterminer les caractéristiques de l'épithélium on peut utiliser trois types de mesure.

Mesure en circuit ouvert.

On mesure la différence de potentiel existant d'une part et d'autre de la couche cellulaire. Puis à temps fixe, on envoie dans le circuit un courant paramétrable i (μA) qui provoque une variation de différence de potentiel ΔV proportionnelle à la résistance du circuit.

Mesure en courant de court-circuit.

On introduit dans le circuit un courant i , ajustable, qui utilise la résistance du tissu pour créer une différence de potentiel qui va s'ajouter algébriquement à celle existante. Quand le courant a la valeur I_{sc} (courant de court-circuit) V_t est nul ; $I_{sc} \times R_t - E_t = 0$ ou $I_{sc} = E_t/R_t$. Dans ces conditions $V_m - V_s = 0$ et $V_m = V_s$, les deux membranes muqueuse et séreuse sont au même potentiel. Pour déterminer la résistance on impose au circuit une différence de potentiel choisie et on mesure la résistance en appréciant la déviation du courant I_{sc} qui en résulte.

Mesure en voltage imposé.

C'est un cas particulier de la mesure en courant de court-circuit où l'on impose à l'épithélium d'avoir un potentiel nul. Dans ces conditions on fixe le potentiel transépithélial sans connaître le potentiel de chacune des membranes. Pour cela on surimpose une différence de potentiel en prolongeant l'ajout algébrique de courant qui sert à la mesure de la résistance. On choisit un temps court pour le courant de court-circuit et un temps long pour le surajout. Il est clair que la différence de potentiel va dépendre, pour une résistance donnée de la capacité de l'appareil à délivrer un courant maximum ($100 \mu\text{A}$; pour 500 ohms la différence de potentiel est de 50 mV) mais aussi de pouvoir mesurer la différence de potentiel résultante (1 V).

Pour réaliser ces mesures les cupules sont montées dans une chambre de Ussing modifiée. Nous utilisons une unité de contrôle "courant-voltage clamp" (WPI), couplée à un générateur d'impulsions permettant la production de courbe intensité, voltage. Le signal recueilli est digitalisé (MacLab) et traité en utilisant le logiciel Chart sur un ordinateur Macintosh Apple.

f) Propriétés de l'épithélium testé.

Dans un premier temps on utilisera l'épithélium formé par les cellules HT29. L'ajout de glucose au milieu de base (milieu salin symétrique, absence
5 de stimulateur) dans le compartiment muqueux provoque une élévation du potentiel transépithélial et du courant de court-circuit sans affecter la résistance. L'épithélium fonctionne comme un absorbeur de glucose qui utilise du côté muqueux un transporteur de glucose Na dépendant, et sans doute un transporteur diffusionnel du côté séreux. Le transport de sodium associé au
10 glucose provoque une différence de potentiel qui peut être inhibée par la phlorizine tandis que le flux net de glucose est mesuré avec des analogues de glucose radiomarqués placés dans les compartiments muqueux ou séreux.

L'ajout dans le milieu d'agents qui provoquent une augmentation du taux d'AMPC induit un accroissement de V_t et de I_{sc} qui est indépendant du glucose.
15 Il paraît lié à la mise en place d'un transport transépithélial de Cl^- (séreux vers muqueux) et implique un transporteur basolatéral de chlorure du côté séreux et un canal chlorure du côté muqueux. Ce transport de Cl^- est associé à un transport d'eau de même sens. L'application, après une élévation du taux d'AMPC, d'agents qui provoquent une élévation du taux de Ca^{2+} intracellulaire
20 entraîne une nouvelle augmentation de V_t et de I_{sc} qui associe, sans doute un passage de Ca^{2+} muqueux vers séreux et un nouveau passage de Cl^- séreux vers muqueux.

g) Mesure des flux de traceurs radioactifs appliqué à l'étude des cellules
25 épithéliales en culture.

Cette technique permet de suivre la cinétique de sortie de l'iodure. Les cellules sont mises en culture dans des plaques 12 puits avec une dilution au 1/10 après passage. Au jour 3, les drogues à tester sont mises en solution dans
30 du milieu B (37°C) en fonction de la concentration voulue. Les puits sont lavés 2 fois avec 1 ml de milieu B NaOH, 0,1 % glucose, qui est ensuite remplacé par 1 ml de solution de charge pendant 30 min.

La cinétique de sortie de l'iodure est réalisée après avoir éliminé la solution de charge et lavé 3 fois les puits par 1,5 ml de milieu B. Pour cela 1 ml
35 de milieu B est laissé 1 min dans le puits et récupéré dans un tube à hémolyse pour être remplacé par 1 ml de milieu B neuf. La première minute sert de contrôle, le produit à tester est rajouter à partir de la deuxième minute.

L'opération est répétée sur 10 min puis, les cellules sont décrochées avec 1 ml de NaOH 0,1N SDS 0,1 %. Le contenu de chaque puits est récupéré dans un tube à hémolyse après 25 mn d'agitation et les tubes sont comptés 2 min dans un compteur gamma.

B) Résultats

L'étude concerne des molécules de la famille des benzoquinoliziniums, décrites ci-dessus. Elles sont testées pour leur capacité à activer le canal CFTR. Le criblage des molécules en tant qu'ouvriers du canal CFTR a été réalisé en mesurant leur effet sur l'efflux d'iodure radioactif et sur les courants de chlorure transmembranaires (Becq et al., 1993a). Ces données ont été complétées par la mesure du taux d'AMP cyclique (AMPc) intracellulaire et de ses variations dans diverses situations expérimentales

Trois modèles cellulaires ont été utilisés pour évaluer l'effet d'activation du CFTR par les benzoquinoliziniums : l'ovocyte de Xénope injecté avec de l'ARN codant pour le CFTR (cet ARN étant désigné par la suite ARNc-CFTR); la cellule recombinante CHO exprimant de manière stable la protéine CFTR, et la cellule colonique humaine de lignée HT29 exprimant constitutivement la protéine CFTR. Le canal CFTR étant principalement régulé par des protéines kinases A stimulés par le taux d'AMPc intracellulaire, les expériences contrôles ont fait appel à des dérivés de l'AMPc capables de passer la membrane cellulaire, et à la forskoline activateur de l'enzyme adénylate cyclase conduisant à la synthèse d'AMPc dans une cellule. La figure 1 montre une telle activation obtenue avec 500 μ M de cpt-AMPc (8-(4-chlorphénylthio)-adénosine-3',5'-monophosphate, cyclique), un analogue de l'AMPc traversant la membrane des cellules. L'activation du canal CFTR, mesurée par l'efflux de iodure, induit une augmentation de l'amplitude de l'efflux d'iodure (exprimé en % du contenu cellulaire au temps t=0) et de la vitesse de sortie de l'iodure (pente des courbes à l'origine).

Les expériences contrôle permettant d'évaluer l'efficacité des molécules testées sur l'activité du canal CFTR sont les suivantes :

1) ovocyte de Xénope : efflux de iodure radioactif et courant chlorure transmembranaire dans :

- ovocytes injectés avec l'ARNc-CFTR (notés CFTR sur la figure 1 B);
- les mêmes ovocytes en présence d'activateurs de la voie AMPc (cpt-AMPc, forskoline);
- ovocytes injectés avec de l'eau (notés "eau" sur la figure 1 B) aux lieu et place de l'ARNc-CFTR;
- les mêmes ovocytes mis en présence d'activateurs, ci-dessus mentionnés, de la voie AMPc.

2) cellule CHO : efflux de iodure radioactif dans

- cellules CHO non transfectées avec la protéine CFTR (notées, CHO-CFTR(-) sur la figure 2 B) en présence ou non d'activateurs, ci-dessus mentionnés;
- cellules CHO transfectées avec le gène CFTR (notées, CHO-CFTR(+) sur la figure 2 B) en présence ou non des activateurs, ci-dessus mentionnés.

3) cellule HT29 : efflux d'iodure radioactif dans

- cellules HT29 en l'absence d'activateur (notées basal sur la figure 3);
- cellules en présence d'activateurs (notées AMPc sur la figure 3), ci-dessus mentionnés.

La présence d'un canal chlorure activé par l'augmentation du niveau du calcium intracellulaire a été testé en présence de l'ionophore calcium A23187. Les effets des activateurs de l'AMPc, de l'A23187 et des benzoquinoliziniums ont été évalués dans ces diverses conditions expérimentales (considérées *mutatis mutandis* comme contrôle, notés basal) par leur capacité à favoriser l'efflux de iodure radioactif et à augmenter le courant chlorure transmembranaire.

Les figures 2 A et 2 B montrent l'activation du CFTR par 500 μ M de cpt-AMPc dans la cellule recombinante CHO exprimant CFTR. Dans la cellule CHO (CFTR-) témoin le cpt-AMPc est sans effet. Dans la cellule HT29 le canal CFTR est stimuable par l'AMPc comme le montre l'augmentation de l'amplitude du flux de iodure en présence de 500 μ M de cpt-AMPc (figure 3 A et B).

Effet des benzoquinoliziniums sur l'activation du canal CFTR dans la cellule CHO

La figure 4 montre l'effet du dérivé MPB-07 (500 μ M) sur l'efflux d'iodure dans la cellule CHO (CFTR+) et CHO (CFTR-). L'activation de l'efflux d'iodure dans la cellule CHO (CFTR+) est comparable, en intensité et vitesse, à celle induite par la forskoline (5 μ M), activateur de l'AMPc, dans les cellules CHO (CFTR+) (figure 5). Les résultats concernant les effets du dérivé MPB-07 sur l'efflux d'iodure dans les cellules CHO (CFTR-) et CHO (CFTR+) sont résumés dans les histogrammes des figures 6 et 7, respectivement. MPB-07 (500 μ M) stimule aussi efficacement l'efflux d'iodure que le fait la forskoline (5 μ M) sur les cellules CHO (CFTR+) (figure 7). Sur ces mêmes cellules, A23187 (10 μ M) est sans effet. Dans les cellules CHO (CFTR-), forskoline (5 μ M), A23187 (10 μ M), soit séparément soit ajoutés conjointement, ainsi que MPB-07 (500 μ M) ne modifient pas significativement le niveau basal de l'efflux d'iodure (figure 6).

Effet des benzoquinoliziniums sur l'activation du canal CFTR dans la cellule HT29

L'effet du MPB-07 sur l'efflux de iode dans la cellule recombinante CHO est reproduit dans la cellule épithéliale HT29. L'application de 500 μ M de cpt-AMPc (figure 8 A) ou de 500 μ M de MPB-07 (figure 8 B) déclenche, avec une vitesse et une amplitude similaire un efflux d'iodure accru par rapport au niveau basal (sans activateur) (figure 9).

Effet des benzoquinoliziniums sur l'activation du canal CFTR exprimé dans l'ovocyte de Xénope

MPB-07 (500 μ M) stimule l'efflux d'iodure dans l'ovocyte de Xénope. Cette activation (figure 10 A) est comparable à celle obtenue par l'application de 500 μ M de cpt-AMPc (figure 10 B) et significativement différente (figure 11) de l'efflux mesuré dans l'ovocyte non-injecté stimulé (AMPc, et MPB-07) et non stimulé (basal) (figure 11, eau) et dans l'ovocyte non stimulé mais exprimant CFTR (figure 10 A, efflux noté CFTR basal).

Etude structure-fonction des benzoquinoliziniums et corrélation avec l'ouverture du CFTR

L'étude a porté sur 16 dérivés de noyau benzoquinolizinium.

Les tableaux 1 et 2 présentent la structure chimique des composés de la famille des benzoquinoliziniums testés ici en tant qu'activateur du canal CFTR.

Les tableaux 1 et 2 présentent les résultats relatifs aux efflux mesurés en présence des différents composés testés sur la cellule CHO (CFTR+) recombinante. Le composé de base, le phenanthrène (tableau 2) n'active pas le canal CFTR. Deux séries de molécules ont été testées : série NH₂ (tableau 1, MPB-26, MPB-01 à 04; tableau 2: MPB-24) et série OH (tableau 1, MPB-05 à 08, MPB-27, 29, 30 et 32; tableau 2: MPB-25). Les pourcentages d'activation du canal CFTR sont donnés dans les tableaux correspondants. Ils montrent que la série OH active CFTR avec des pourcentages compris entre 15 et 110 %. La série NH₂ est moins active (10 à 30 %).

Dans la série OH, l'efficacité est la suivante :

MPB-05, 08, 25, 32 < 30 < 29 < 06 < 27, 07

De l'ensemble des composés étudiés, il apparaît que la présence du groupement OH en position 6 est déterminante quant à la capacité d'activer le canal CFTR :

. 9 composés avec OH en position 6 : 45 % d'activation du canal CFTR

. 6 composés avec NH₂ en position 6 : 13 % d'activation du canal CFTR.

Effet des benzoquinoliziniums sur l'AMPc intracellulaire

La figure 12 présente les taux en AMPc cellulaire dans la cellule CHO recombinante mesurés après 5min en présence de 5μM de forskoline (activateur de l'enzyme de synthèse de l'AMPc ; adénylate cyclase), de 10μM de rolipram (un inhibiteur de l'enzyme de dégradation de l'AMPc : la phosphodiesterase de type IV) et de 500μM de MPB-07. Le même niveau d'AMPc est atteint en présence des composés MPB-07 et du rolipram mais seul MPB-07 déclenche l'activation du canal CFTR. L'effet forskoline sur l'AMPc est multiplié par un facteur d'environ 4 suggérant que cet effet est purement dépendant de l'AMPc. Le rolipram n'a aucun effet activateur de CFTR mesuré en flux de iodure et en

patch-clamp. Ces résultats montrent que le composé MPB-07 stimule le canal CFTR par une voie indépendante de la voie de l'AMPc cellulaire.

C) Conclusion

5

Ces résultats montrent que le composé MPB-07 et certains membres de la famille des benzoquinoliziniums stimulent l'ouverture du canal CFTR par une voie indépendante de l'AMPc ou du calcium intracellulaire. Ces molécules représentent donc une nouvelle famille d'activateurs du canal CFTR.

10

15

Légendes des figures

- Figure 1 : effet du cpt-AMPC sur l'efflux d'iodure radioactif, dans l'ovocyte de Xénope ;

. figure 1 A : courbes de l'efflux de ^{125}I (% en ordonnée) en fonction de temps (mn en abscisse) ; la courbe passant par des points représentés par des carrés noirs correspond à l'efflux de ^{125}I mesuré en fonction de temps dans des ovocytes injectés avec l'ARNc-CFTR (courbe désignée CFTR basal) ; la courbe passant par des points représentés par des carrés blancs correspond à l'efflux de ^{125}I mesuré en fonction de temps dans des ovocytes injectés avec l'ARNc-CFTR et activés par cpt-AMPC (courbe désignée CFTR+AMPC) ;

. figure 1 B : histogrammes de l'efflux de ^{125}I dans les ovocytes non activés par cpt-AMPC (représentés en noir) et dans les ovocytes activés par cpt-AMPC (représentés en blanc) ; à gauche sont représentés les ovocytes activés ou non par cpt-AMPC et injectés avec de l'eau (notés "eau") ; à droite sont représentés les ovocytes activés ou non par cpt-AMPC et injectés avec l'ARNc-CFTR (notés "CFTR") ; n représente le nombre d'expériences.

- Figure 2 : effet du cpt-AMPC sur l'efflux d'iodure radioactif dans les cellules CHO ;

. figure 2 A : courbes de l'efflux de ^{125}I (% en ordonnée) en fonction de temps (mn en abscisse) ; la courbe passant par des points représentés par des triangles noirs correspond à l'efflux de ^{125}I mesuré en fonction de temps dans des cellules CHO non activées par cpt-AMPC (courbe désignée basal) ; la courbe passant par des points représentés par des triangles blancs correspond à l'efflux de ^{125}I mesuré en fonction de temps dans des cellules CHO activées par cpt-AMPC (courbe désignée AMPC) ;

. figure 2 B : histogrammes de l'efflux de ^{125}I dans les cellules CHO non activées par cpt-AMPC (représentées en blanc) ; à gauche sont représentées les cellules CHO activées ou non par cpt-AMPC et non transfectées avec le gène CFTR (notées CHO (CFTR-)) ; à droite sont représentées les cellules CHO activées ou non par cpt-AMPC et transfectées avec le gène CFTR (notées CHO (CFTR+)) ; n représente le nombre d'expériences.

35

- Figure 3 : effet du cpt-AMPC sur l'efflux d'iodure radioactif dans les cellules HT29 ;

figure 3 A : courbes de l'efflux de ^{125}I (% en ordonnée) en fonction de temps (mn en abscisse) ; la courbe passant par des points représentés par des carrés noirs correspond à l'efflux de ^{125}I mesuré en fonction de temps dans des cellules HT29 non activées par cpt-AMPC (courbe désignée basal) ; la courbe passant par des points représentés par des carrés blancs correspond à l'efflux de ^{125}I mesuré en fonction de temps dans les cellules HT29 activées par cpt-AMPC (courbe désignée AMPC) ;

figure 3 B : histogrammes de l'efflux de ^{125}I dans les cellules HT29 non activées par cpt-AMPC (en noir), et dans les cellules HT29 activées par cpt-AMPC (en blanc).

Figure 4 : effet du dérivé MPB-07 ($500\mu\text{M}$) sur l'efflux de ^{125}I (% en ordonnée) en fonction de temps (mn en abscisse) dans la cellule CHO ; la courbe passant par des points représentés par des cercles blancs correspond à la mesure de l'efflux de ^{125}I en fonction de temps dans les cellules CHO activées par MPB-07 et transfectées avec le gène CFTR (courbe désignée MPB-07 (CFTR+)) ; la courbe passant par des points représentés par des cercles noirs correspond à la mesure de l'efflux ^{125}I en fonction de temps dans les cellules CHO activées par MPB-07 mais pas transfectées avec le gène CFTR (courbe désignée MPB-07 (CFTR-)).

Figure 5 : effet de la "forskoline" ($500\mu\text{M}$) sur l'efflux de ^{125}I (% en ordonnée) en fonction de temps (mn en abscisse) dans la cellule CHO ; la courbe passant par des points représentés par des triangles blancs correspond à la mesure de l'efflux de ^{125}I en fonction de temps dans les cellules CHO activées par la forskoline et transfectées avec le gène CFTR (courbe désignée forskoline CHO (CFTR+)) ; la courbe passant par des points représentés par des triangles noirs correspond à la mesure de l'efflux ^{125}I en fonction de temps dans les cellules CHO non activées par la forskoline et transfectées avec le gène CFTR (courbe désignée basal CHO (CFTR+)).

Figure 6 : histogrammes de l'efflux de ^{125}I dans les cellules CHO non transfectées avec le gène CFTR (désignées CHO (CFTR-)) et :

- non activées (basal)
- activées par la forskoline (forskoline)
- activées par A23187 (A23187)
- activées par A23187 et la forskoline (A23187 + fsk)

. activées par MPB-07 (MPB-07)
n représente le nombre d'expériences.

- Figure 7 : histogrammes de l'efflux de ^{125}I dans les cellules CHO
5 transfectées avec le gène CFTR (désignées CHO (CFTR+)) et :
. non activées (basal)
. activées par la forskoline (forskoline)
. activées par MPB-07
. activées par A23187 (A23187)
10 n représente le nombre d'expériences.

- Figure 8 : effets comparés du cpt-AMPc (500 μM) et du MPB-07 (500 μM) sur l'efflux de ^{125}I (% en ordonnée) en fonction du temps (mn en abscisse) dans les cellules HT29 ;
15 . figure 8 A : la courbe passant par des points représentés par des carrés noirs correspond à la mesure de l'efflux de ^{125}I en fonction du temps dans les cellules HT29 non activées (courbe désignée basal) ; la courbe passant par des points représentés par des carrés blancs correspond à la mesure de l'efflux de ^{125}I en fonction du temps dans les cellules HT29 activées par cpt-AMPc (courbe désignée AMPc) ;
20 . figure 8 B : la courbe passant par des points représentés par des carrés blancs correspond à la mesure de ^{125}I en fonction du temps dans les cellules HT29 non activées (courbe désignée basal) ; la courbe passant par des points représentés par des carrés noirs correspond à la mesure de l'efflux de ^{125}I en fonction du temps dans les cellules HT29 activées par MPB-07 (courbe désignée MPB-07).
25

- Figure 9 : histogramme de l'efflux de ^{125}I dans les cellules HT29 non activées (basal), activées par cpt-AMPc (AMPc) et activées par MPB-07 (MPB-07) ; n représente le nombre d'expériences.
30

- Figure 10 : effets comparés du cpt-AMPc (500 μM) sur l'efflux de ^{125}I (% en ordonnée) en fonction du temps (non en abscisse) dans les ovocytes de Xénope :
35 . figure 10 A : la courbe passant par des points représentés par des cercles blancs correspond à la mesure de l'efflux de ^{125}I en fonction du temps dans les ovocytes injectés avec de l'eau (courbe désignée eau basal) ; la courbe

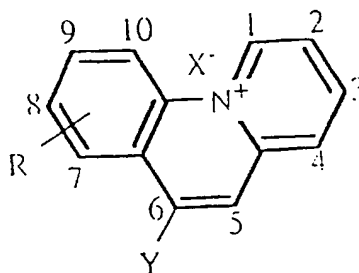
passant par des points représentés par des carrés noirs correspond à la mesure de l'efflux de ^{125}I en fonction du temps dans les ovocytes injectés avec l'ARNc-CFTR (courbe désignée CFTR basal) ; la courbe passant par des points représentés par des carrés blancs correspond à la mesure de l'efflux de ^{125}I en fonction du temps dans les ovocytes injectés avec l'ARNc-CFTR et activés avec cpt-AMPc (courbe désignée CFTR + AMPc) ;

figure 10 B : la courbe passant par des points représentés par des carrés blancs correspond à la mesure de l'efflux de ^{125}I en fonction du temps dans les ovocytes injectés avec l'ARNc-CFTR et activés par MPB-07 (courbe désignée MPB-07).

- Figure 11 : histogrammes de l'efflux de ^{125}I dans les ovocytes de Xénope non activés (basal), ou activés par cpt-AMPc (AMPc), ou activés par MPB-07 (MPB-07), ces ovocytes étant soit injectés avec de l'eau (notés "eau" sur la gauche), soit injectés avec de l'ARNc-CFTR (notés "CFTR" sur la droite); n représente le nombre d'expériences.

- Figure 12 : histogrammes représentant les taux en AMPc (mesurés en nmole par mg de protéine) dans les cellules CHO transfectées avec le gène CFTR et non activées (basal), ou activées par la forskoline (forskoline), ou activées par le rolipran (rolipran), ou activées par MPB-07 (MPB-07).

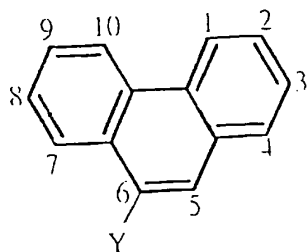
Tableau 1



Composé	X	Y	R	Activation en % par rapport au témoin
MPB-26	Cl	NH ₂	H	30
MPB-03	Cl	NH ₂	9-Cl	18
MPB-04	Cl	NH ₂	7-Cl	11
MPB-06	Br	OH	H	53
MPB-05	Cl	OH	H	20
MPB-07	Cl	OH	10-Cl	110
MPB-08	Cl	OH	9-Cl	22
MPB-27	Cl	OH	7-Cl	95
MPB-30	Cl	OH	8-Cl	28
MPB-29	Cl	OH	9-F	42
MPB-32	Cl	OH	8-Br	13
témoin (basal)				0
forskoline				109

N.B. : forskoline : 5 μ M, MPB et phénanthrène : 500 μ M.

Tableau 2



15

Composé	X	Y	R	Activation en % par rapport au témoin
---------	---	---	---	--

20

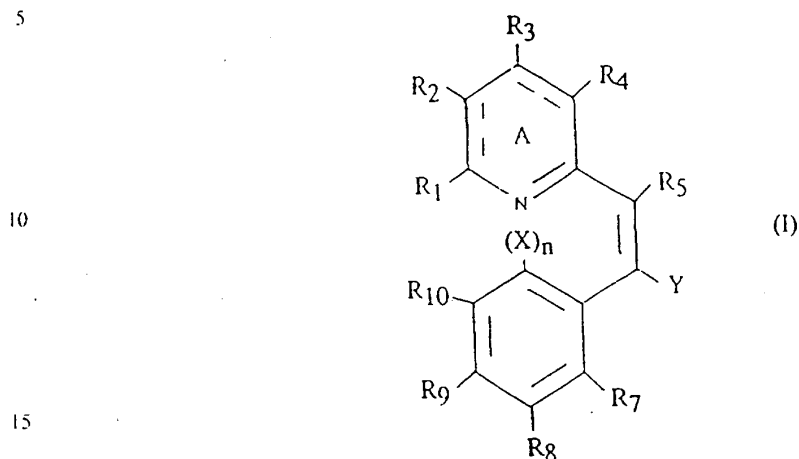
phénanthrène	H	H	H	<5
MPB-24	H	NH ₂	H	18
MPB-25	H	OH	H	25

Bibliographie

- 5 Becq F. et al.(1993a). FEBS Lett. 327 : 337-342
- Becq F. et al. (1993b). Pflügers Arch 425 : 1-8
- Becq F. et al. (1994). PNAS 91, 9160-9164
- 10 Chang X-B et al. (1993). J. Biol Chem. 268 : 11304-11311
- Cutting G.R. et al. (1990). Nature 346 : 366-369
- 15 Dalemans W. et al. (1991). Nature 354 : 526-528
- Dils F. (1979), J. Int. Med. Res 7 : 302-304
- Drumm M.L. et al. (1991). Science 254 : 1797-1999
- 20 Gregory R.J. et al. (1994). Mol. Cell. Biol. 11 : 3886-3893
- Grem J.L. (1990). Cancer cells. 2 : 131-137
- 25 Gribkoff V.K. et al. (1994). J. Biol. Chem. 269 : 10983-10986
- Hamill O.P. et al. (1981). Pflügers Arch 391 : 85-100
- Kerem B-S. et al. (1989). Science 245 : 1073-1080
- 30 Olesen S.P. et al. (1994), Europ. J. Pharm. 251 : 53-59
- Riordan J.R. et al. (1989). Science 245 : 1066-1072
- 35 Sheppard D.N. et al. (1993). Nature 362 : 160-164
- Tabcharani J.A. et al. (1991). Nature 352 : 628-631
- Tsui L-C & Buchwald M. (1991). Advances in human genetic 20 : 153-266
- 40 Van Eygen M. et al. (1976). The Lancet 1 : 382-385

REVENDICATIONS

1. Utilisation de dérivés de formule générale (I) suivante :



dans laquelle :

20 - l'hétérocycle A est aromatique ou non, étant entendu que dans ce dernier cas l'atome d'azote de cet hétérocycle est lié par une double liaison au carbone en position 4a,

25 - R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₇, R₈, R₉ et R₁₀, représentent, indépendamment les uns des autres :

- . un atome d'hydrogène, ou de brome, ou de fluor, ou
 - . un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, ou
 - . un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, d'environ 1 à environ 10 atomes de carbone, ces groupes étant le cas échéant substitués, notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un cycle aromatique et/ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ces cycles étant eux-mêmes, le cas échéant, substitués notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou
- 30
- 35

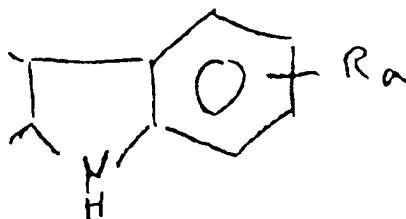
. un cycle aromatique ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ce cycle étant lui-même, le cas échéant, substitué notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

. un groupe $-OR_a$, R_a représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. un groupe $-NR_bR_c$, R_b et R_c , indépendamment l'un de l'autre, représentant un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. lorsque R_1 et R_2 , ou R_3 et R_4 , et/ou R_4 et R_5 , et/ou R_7 et R_8 , et/ou R_8 et R_9 , et/ou R_9 et R_{10} , ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_1 en association avec R_2 , ou R_2 en association avec R_3 , et/ou R_3 en association avec R_4 , et/ou R_4 en association avec R_5 , et/ou R_7 en association avec R_8 , et/ou R_8 en association avec R_9 , et/ou R_9 en association avec R_{10} , forment respectivement avec C_1 et C_2 , ou avec C_2 et C_3 , ou avec C_3 et C_4 , ou avec C_4 , C_{4a} et C_5 , ou avec C_7 et C_8 , ou avec C_8 et C_9 , ou avec C_9 et C_{10} , un cycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, ce cycle étant le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. lorsque R_3 et R_4 ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_3 en association avec R_4 forment un groupe indole de formule



dans laquelle R_a est tel que défini ci-dessus,

- Y représente :

5 un groupe $-OR_d$, R_d représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

10 un groupe $-NR_eR_f$, R_e et R_f indépendamment l'un de l'autre, représentant un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus,

15 étant entendu que lorsque R_d , ou l'un au moins de R_e ou de R_f , ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_d , ou l'un au moins de R_e ou de R_f , en association avec R_5 , ou en association avec R_7 , forment respectivement avec C_5 et C_6 , ou avec C_6 , C_{6a} et C_7 , un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

20 - n est égal à 0 ou 1, avec :

lorsque n est égal à 0 :

25 * X représente un atome sous forme anionique, tel qu'un atome d'halogène, notamment un atome de brome ou de chlore, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, tel qu'un perchlorate, et l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I) est sous forme quaternaire et est lié d'une part par liaison covalente au carbone en position 11, et, d'autre part, par liaison ionique à X défini ci-dessus,

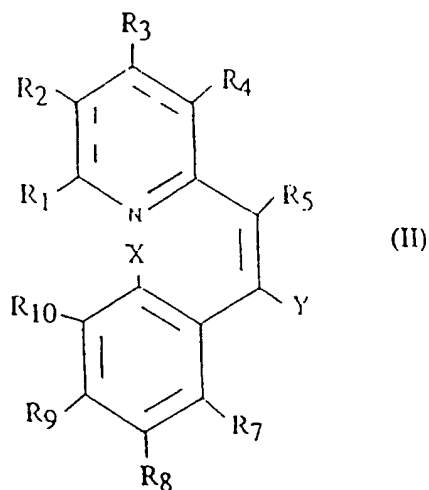
30 * étant entendu que lorsque R_1 et R_{10} ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_1 en association avec R_{10} forment avec C_1 , l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I), C_{11} , et C_{10} , un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

35 lorsque n est égal à 1, alors X représente un atome d'hydrogène, ou un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor,

pour la préparation de médicaments destinés au traitement de pathologies, notamment pulmonaires, digestives ou cardiaques, liées à des troubles des flux ioniques transmembranaires, notamment de chlore et, le cas échéant, de bicarbonate, dans l'organisme (humain ou animal), notamment pour la

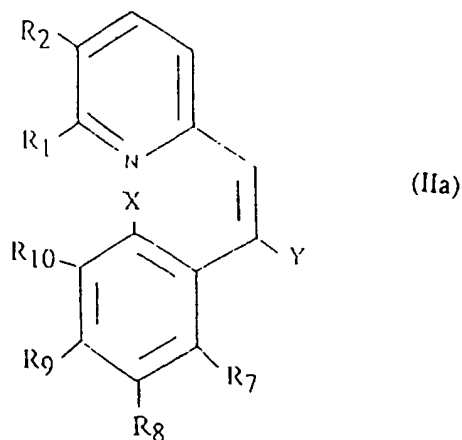
5 préparation de médicaments destinés au traitement de la mucoviscidose, ou à la prévention du rejet de drogues cytotoxiques (notamment antitumorales), ou au traitement des obstructions des voies bronchiques ou des voies digestives (notamment pancréatique ou intestinale)

10 2. Utilisation selon la revendication 1, de dérivés de formule générale (I) dans laquelle $n = 1$, et correspondant aux dérivés de formule générale (II) suivante :



25 dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , X et Y sont tels que définis dans la revendication 1.

30 3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, de dérivés de formule générale (IIa) suivante :



dans laquelle :

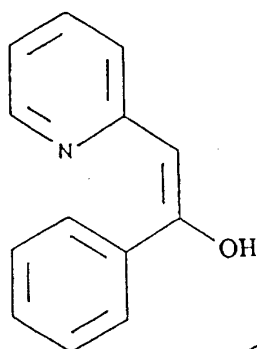
- R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C₁ et C₂ un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,

- Y représente un groupe -OH ou -NH₂,

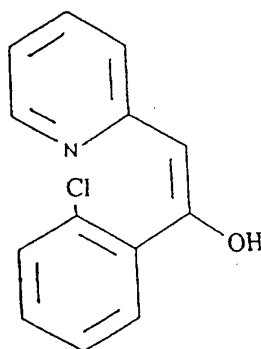
- R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R₇, R₈, R₉ ou R₁₀, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

- X représente un atome d'hydrogène ou un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor.

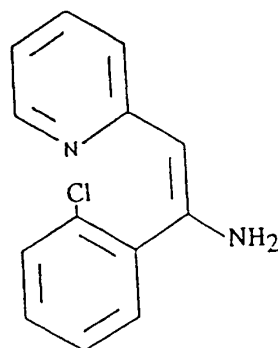
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, de dérivés de formule générale (IIa) choisis parmi les suivants :



(composé 1)

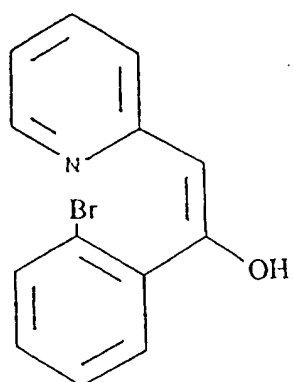


(composé 2)



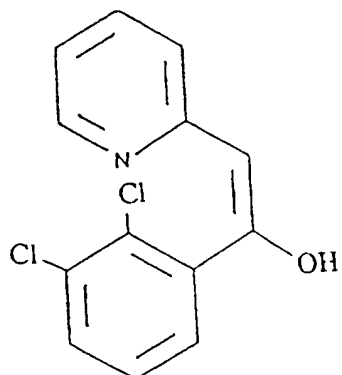
(composé 3)

5



(composé 4)

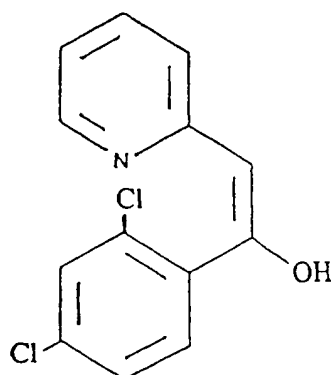
10



(composé 5)

15

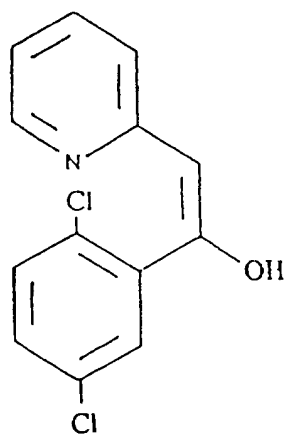
20



(composé 6)

25

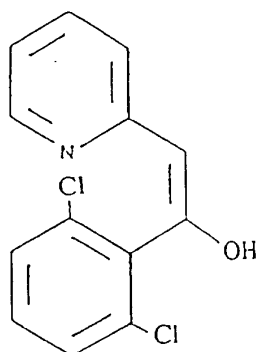
30



(composé 7)

35

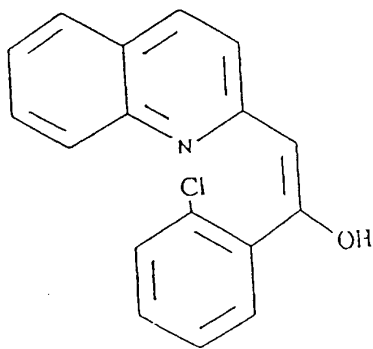
5



(composé 8)

10

15

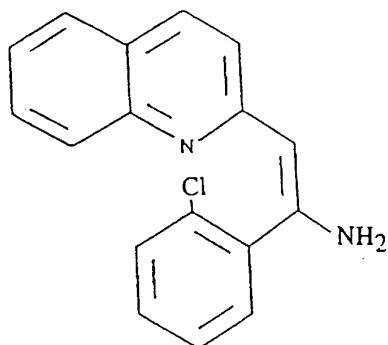


(composé 9)

20

25

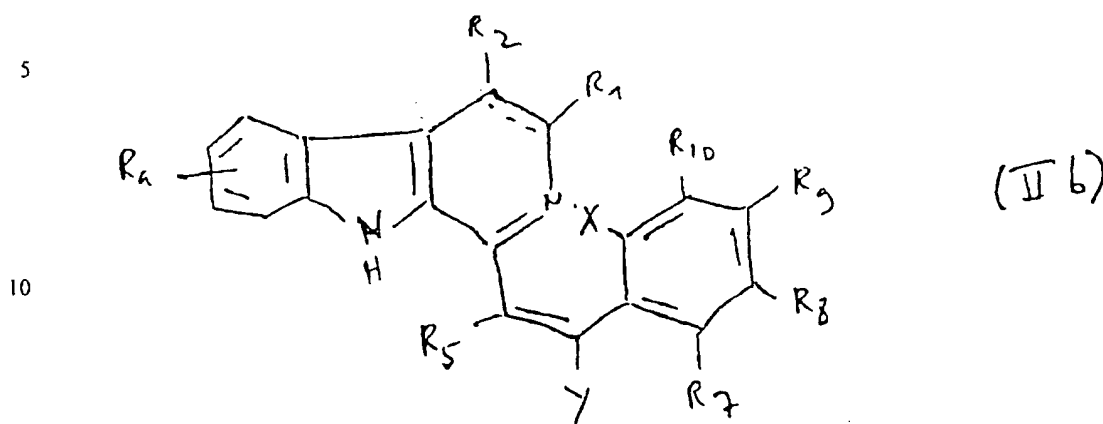
30



(composé 10)

35

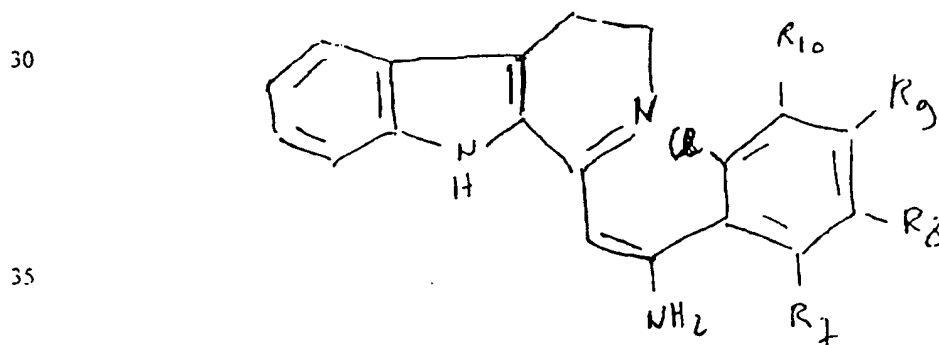
5. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, de composés de formule générale (IIb) suivante :



15 dans laquelle R_4 , R_1 , R_2 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , X et Y sont tels que définis ci-dessus, et notamment les composés de formule (IIb) dans laquelle :

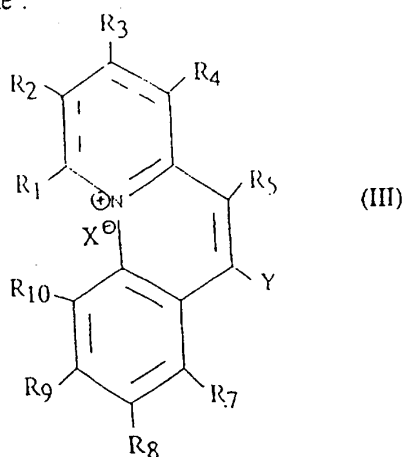
- R_4 représente un atome d'hydrogène,
- R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène, et il n'y a pas de double liaison entre les deux carbones portant R_1 et R_2 ,
- R_5 représente un atome d'hydrogène,
- R_7 , R_8 , R_9 et R_{10} représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

25 6. Utilisation selon la revendication 5, de dérivés de formule (IIb) choisis parmi les suivants :



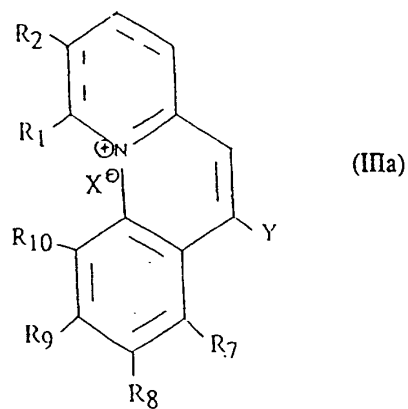
- composé A : $R_7 = \text{Cl}$, $R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé B : $R_7 = R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé C : $R_8 = \text{Cl}$, $R_7 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé D : $R_9 = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$,
- composé E : $R_{10} = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_9 = \text{H}$,
- composé F : $R_9 = \text{Br}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$.

7. Utilisation selon la revendication 1, de dérivés de formule générale (I) dans laquelle $n = 0$, et correspondant aux dérivés des benzo[c] quinoliziniums de formule (III) suivante :



dans laquelle $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7, R_8, R_9, R_{10}, X$ et Y sont tels que définis dans la revendication 1.

8. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 7 de dérivés de formule générale (IIIa) suivante :



dans laquelle :

- R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C₁ et C₂ un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,

- Y représente un groupe -OH ou -NH₂, ou -NHCOCH₃,

- R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R₇, R₈, R₉ ou R₁₀, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, notamment un perchlorate ClO₄⁻.

9. Utilisation selon la revendication 8, de composés de formule (IIIa) dans laquelle :

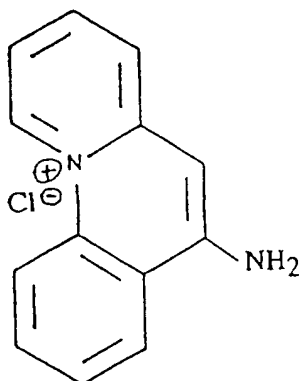
- R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène,

- Y représente un groupe -OH,

- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, notamment un perchlorate ClO₄⁻,

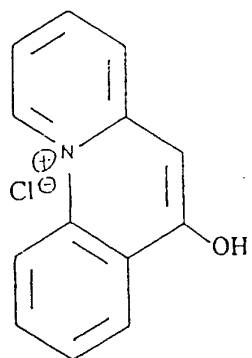
- R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent indépendamment les uns des autres un atome d'hydrogène ou un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor.

10. Utilisation selon la revendication 1 ou l'une des revendications 7 à 9, de dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule générale (IIIa) choisis parmi les suivants :



(composé 11 ou MPB-26)

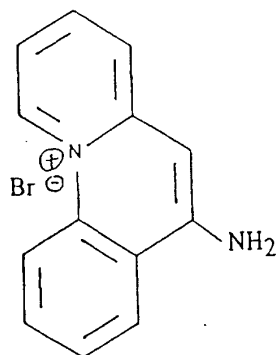
5



(composé 12 ou MPB-05)

10

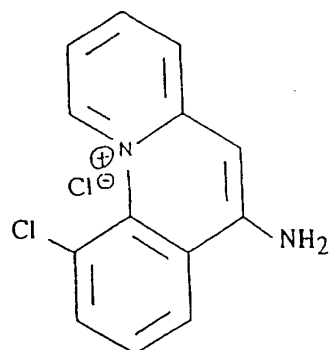
15



(composé 13 ou MPB-01)

20

25

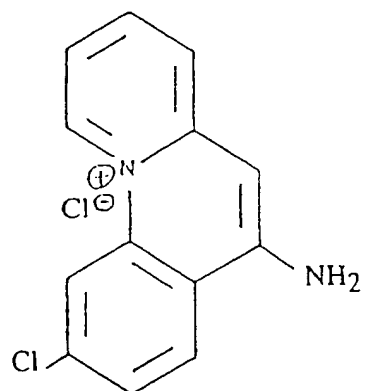


(composé 14 ou MPB-02)

30

35

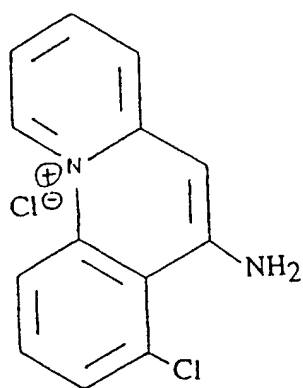
5



(composé 15 ou MPB-03)

10

15

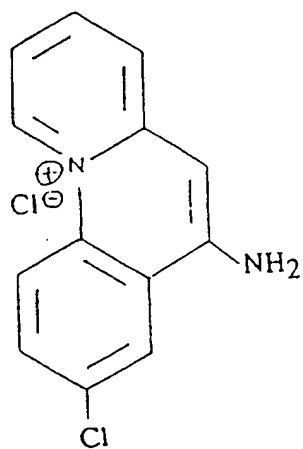


(composé 16)

20

25

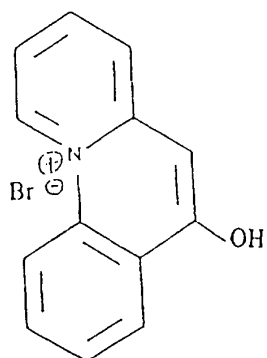
30



(composé 17)

35

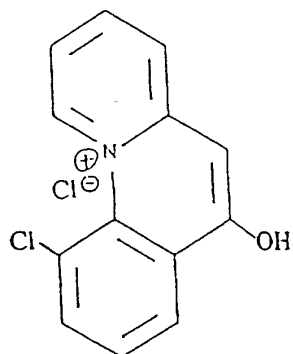
5



(composé 18 ou MPB-06)

10

15

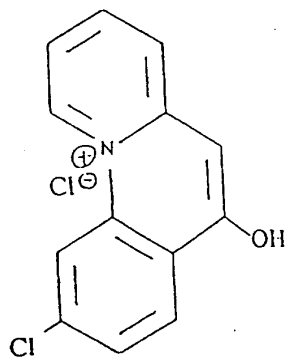


(composé 19 ou MPB-07)

20

25

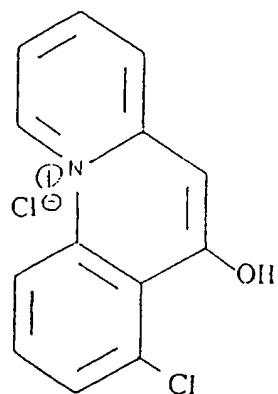
30



(composé 20 ou MPB-08)

35

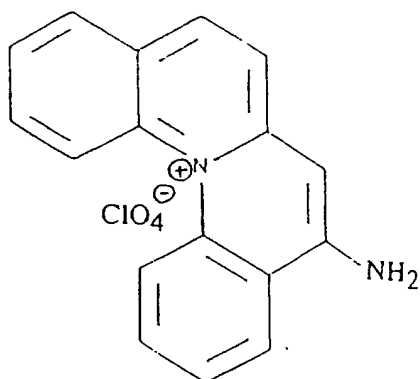
5



(composé 21 ou MPB-27)

10

15

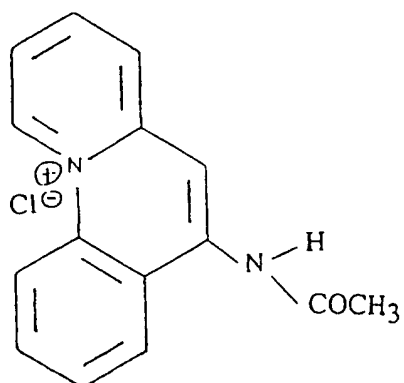


(composé 22)

20

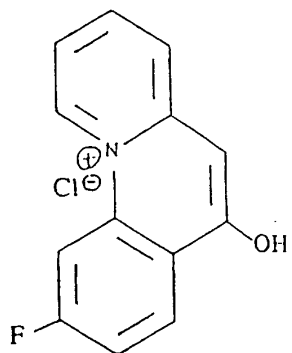
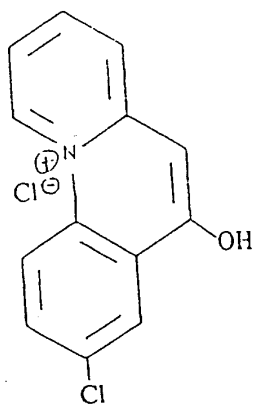
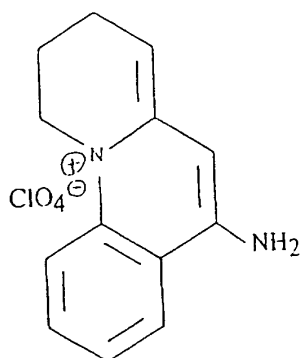
25

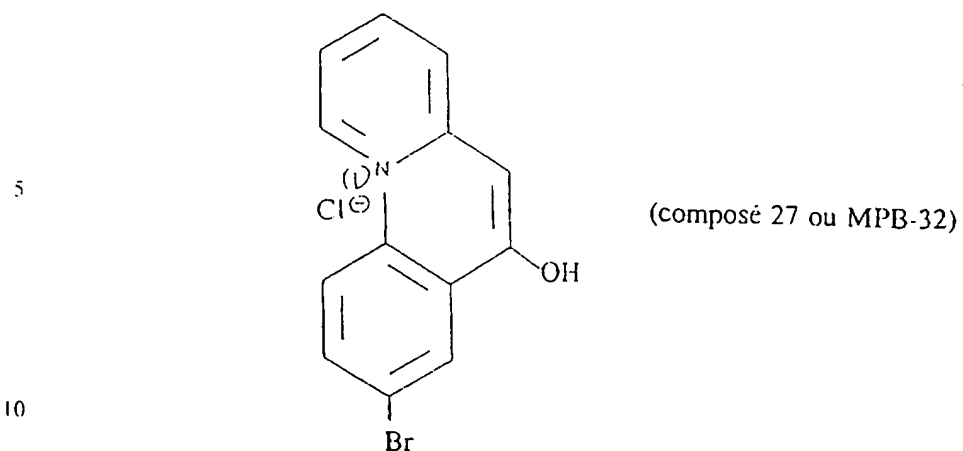
30



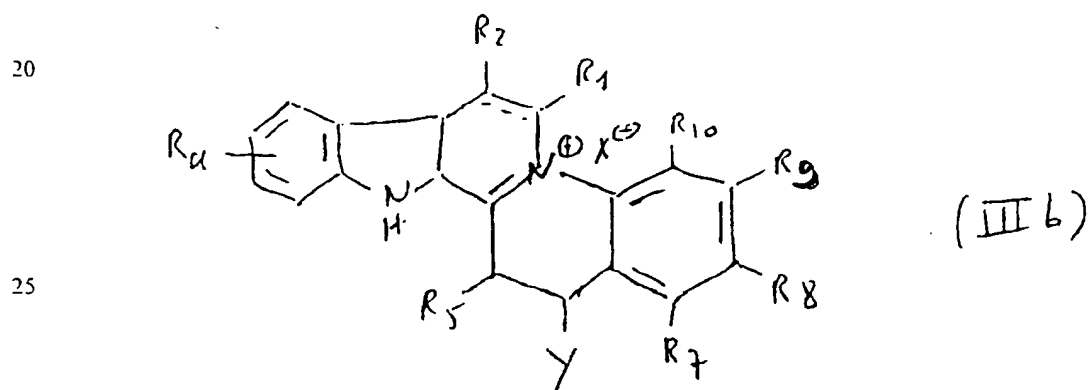
(composé 23)

35





15 11. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 5, de dérivés de formule générale (IIIb) suivante :



30 dans laquelle R_a , R_1 , R_2 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , X et Y sont tels que définis ci-dessus, et notamment les composés de formule (IIIb) dans laquelle :

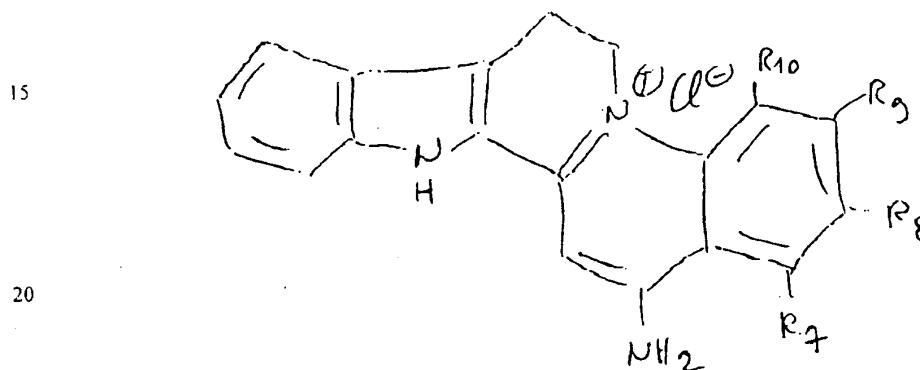
- R_a représente un atome d'hydrogène,
- R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène, et il n'y a pas de double liaison entre les deux carbones portant R_1 et R_2 ,
- 35 - R_5 représente un atome d'hydrogène,

- R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R₇, R₈, R₉ ou R₁₀ représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

5 - Y représente -NH₂,

- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, notamment un perchlorate ClO₄⁻.

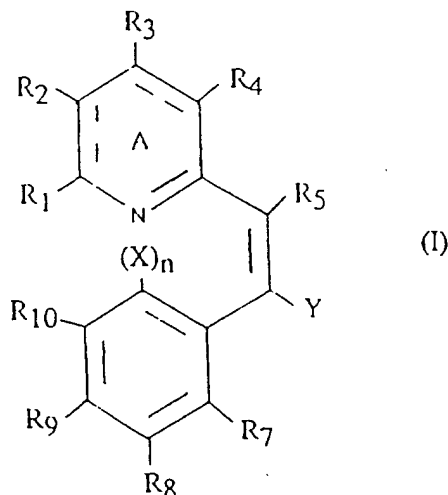
10 12. Utilisation selon la revendication 1, de dérivés de formule générale (IIIb) choisis parmi les suivants :



- 25
- composé G : R₇ = Cl, R₈ = R₉ = R₁₀ = H,
 - composé H : R₇ = R₈ = R₉ = R₁₀ = H,
 - composé I : R₈ = Cl, R₇ = R₉ = R₁₀ = H,
 - composé J : R₉ = Cl, R₇ = R₈ = R₁₀ = H,
 - composé K : R₁₀ = Cl, R₇ = R₈ = R₉ = H,
 - 30 - composé L : R₉ = Br, R₇ = R₈ = R₁₀ = H.

13. Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent, à titre de principe(s) actif(s), au moins un des dérivés de formule générale (I) suivante :

35



dans laquelle :

15 - l'hétérocycle A est aromatique ou non, étant entendu que dans ce dernier cas l'atome d'azote de cet hétérocycle est lié par une double liaison au carbone en position 4a,

20 - R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₇, R₈, R₉ et R₁₀, représentent, indépendamment les uns des autres :

25 . un atome d'hydrogène, ou de brome, ou de fluor, ou
 . un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, ou
 . un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, d'environ 1 à environ 10 atomes de carbone, ces groupes étant le cas échéant substitués, notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un cycle aromatique et/ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ces cycles étant eux-mêmes, le cas échéant, substitués notamment par un halogène,
 30 et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

35 . un cycle aromatique ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ce cycle étant lui-même, le cas échéant, substitué notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

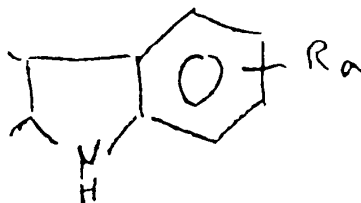
un groupe $-OR_a$, R_a représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

5 un groupe $-NR_bR_c$, R_b et R_c , indépendamment l'un de l'autre, représentant un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

10 lorsque R_1 et R_2 , ou R_3 et R_4 , et/ou R_4 et R_5 , et/ou R_7 et R_8 , et/ou R_8 et R_9 , et/ou R_9 et R_{10} , ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_1 en association avec R_2 , ou R_2 en association avec R_3 , et/ou R_3 en association avec R_4 , et/ou R_4 en association avec R_5 , et/ou R_7 en association avec R_8 , et/ou R_8 en association avec R_9 , et/ou R_9 en association avec R_{10} , forment respectivement avec C_1 et C_2 , ou
15 avec C_2 et C_3 , ou avec C_3 et C_4 , ou avec C_4 , C_{4a} et C_5 , ou avec C_7 et C_8 , ou avec C_8 et C_9 , ou avec C_9 et C_{10} , un cycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, ce cycle étant le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que
20 définis ci-dessus, ou

lorsque R_3 et R_4 ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_3 en association avec R_4 forment un groupe indole de formule

25



30

dans laquelle R_a est tel que défini ci-dessus,

- Y représente :

35 un groupe $-OR_d$, R_d représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. un groupe $-NR_eR_f$, R_e et R_f indépendamment l'un de l'autre, représentant un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus,

5 . étant entendu que lorsque R_d , ou l'un au moins de R_e ou de R_f , ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_d , ou l'un au moins de R_e ou de R_f , en association avec R_5 , ou en association avec R_7 , forment respectivement avec C_5 et C_6 , ou avec C_6 , C_{6a} et C_7 , un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

- n est égal à 0 ou 1, avec :

15 . lorsque n est égal à 0 :

* X représente un atome sous forme anionique, tel qu'un atome d'halogène, notamment un atome de brome ou de chlore, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, tel qu'un perchlorate, et l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I) est sous forme quaternaire et est lié d'une part par liaison covalente au carbone en position 11, et, d'autre part, par liaison ionique à X défini ci-dessus,

* étant entendu que lorsque R_1 et R_{10} ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_1 en association avec R_{10} forment avec C_1 , l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I), C_{11} , et C_{10} , un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, ou oxycarbonyle, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

25 . lorsque n est égal à 1, alors X représente un atome d'hydrogène, ou un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

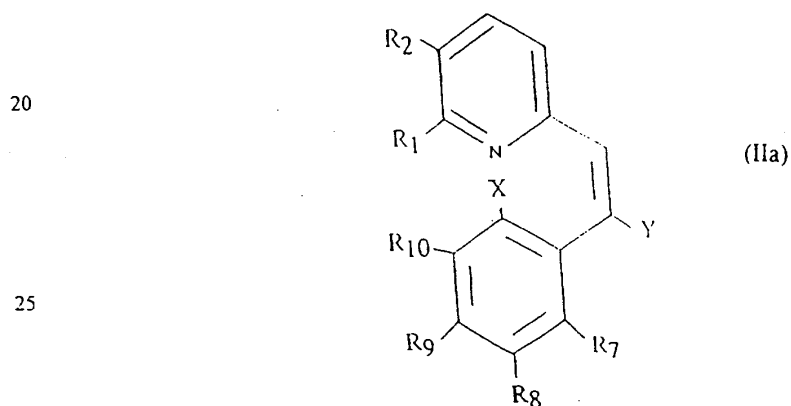
14. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 13, caractérisées en ce qu'elles comprennent, à titre de principe(s) actif(s), au moins un des dérivés de formule (II) tels que définis dans l'une des revendications 1 à 6.

15. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 13, caractérisées en ce qu'elles comprennent, à titre de principe(s) actif(s), au moins un des dérivés de formule (III) tels que définis dans l'une des revendications 7 à 12.

5 16. Compositions pharmaceutiques selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous une forme administrable par voie orale, notamment sous forme de comprimés, ou de gélules, ou sous une forme administrable par voie parentérale, notamment sous forme de préparations injectables par voie intraveineuse, intramusculaire, ou sous-cutanée, ou encore
10 par voie aérienne, notamment par voie pulmonaire sous forme d'aérosols.

17. Compositions pharmaceutiques selon l'une des revendications 13 à 16, caractérisées en ce que les quantités de principe(s) actif(s) sont telles que la posologie journalière en principe(s) actif(s) est d'environ 0,1 mg/kg à 5 mg/kg,
15 notamment d'environ 3 mg/kg, en une ou plusieurs prises.

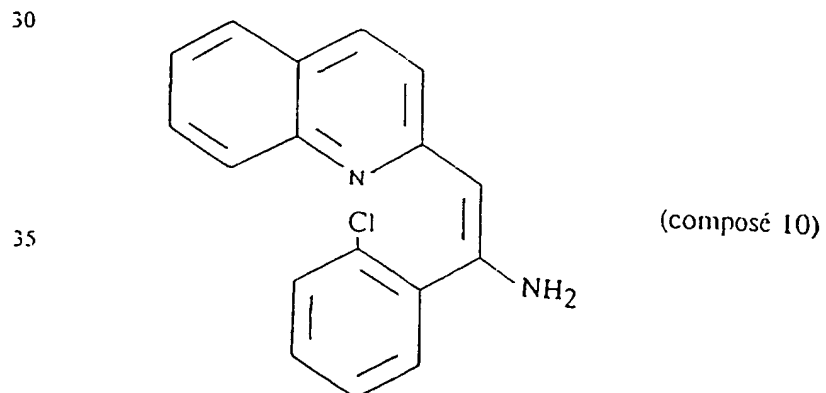
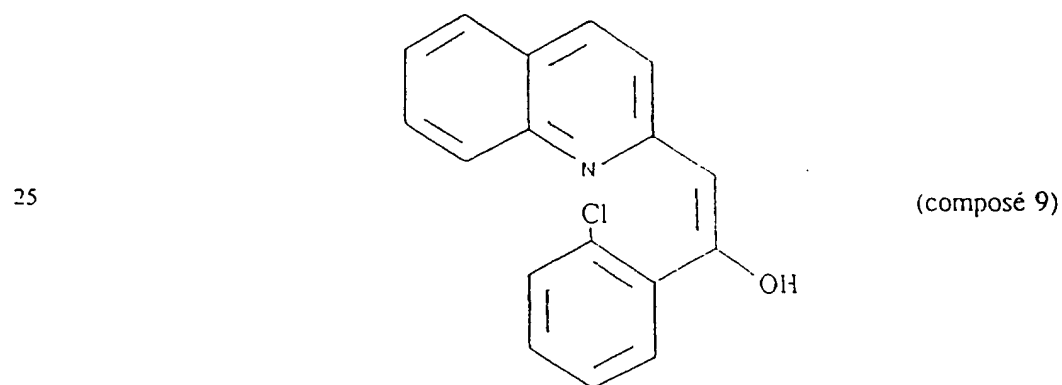
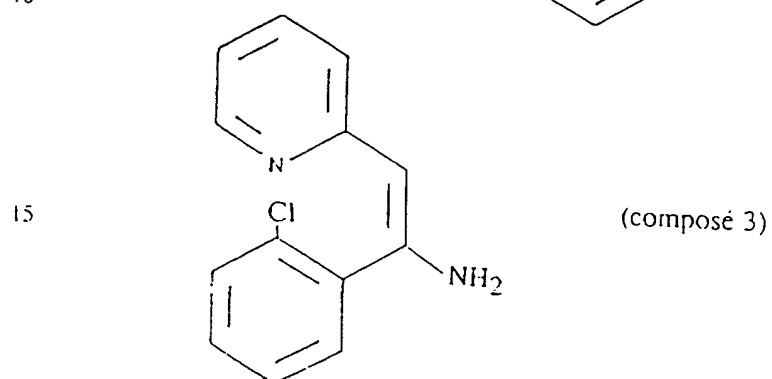
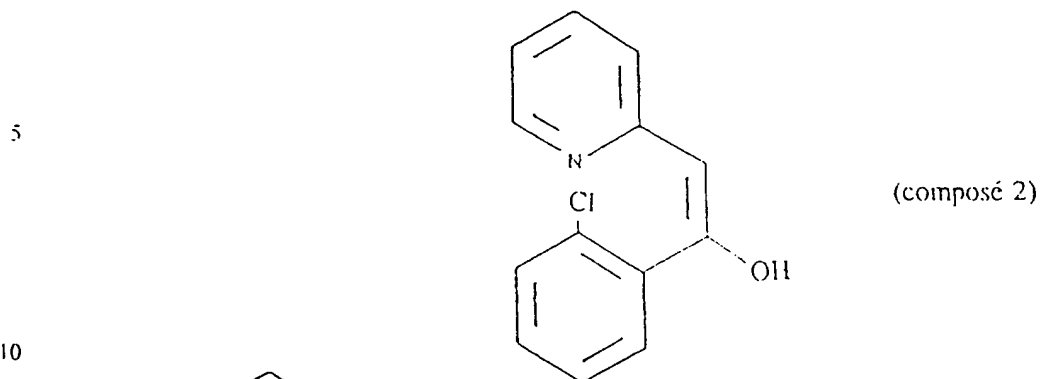
18. Dérivés de formule générale (IIa) suivante :



dans laquelle :

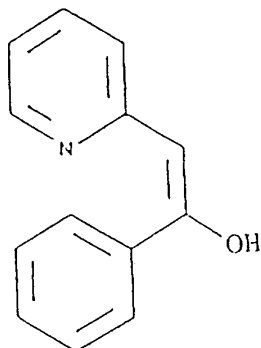
- 30
- R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C₁ et C₂ un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,
 - Y représente un groupe -OH ou -NH₂,
 - R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R₇, R₈, R₉ ou R₁₀, représente un atome d'halogène, notamment un atome de
35 chlore, de brome ou de fluor,
 - X représente un atome d'hydrogène ou un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor,

les composés de formules suivantes étant exclus :



19. Dérivés selon la revendication 18, de formule générale (IIa) choisis parmi les suivants :

5

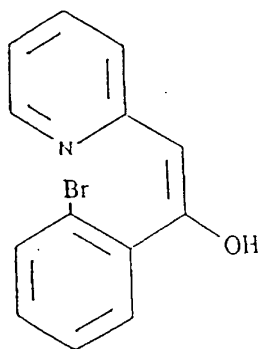


(composé 1)

10

15

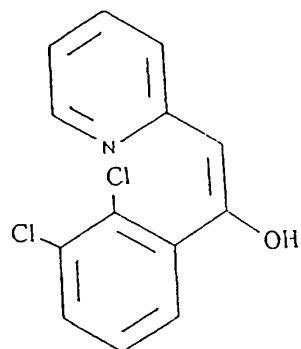
20



(composé 4)

25

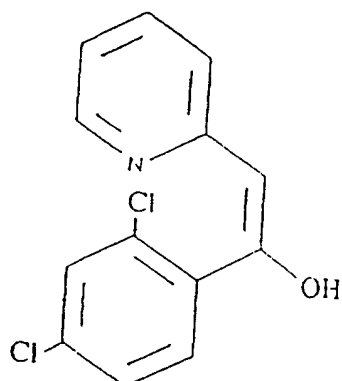
30



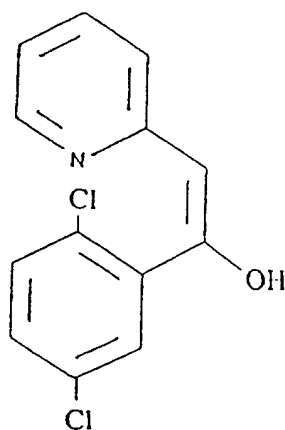
(composé 5)

35

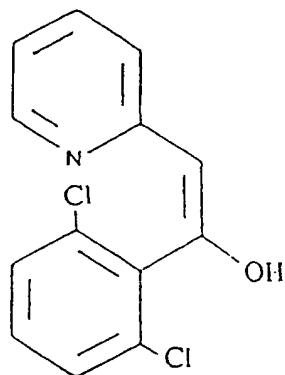
84



(composé 6)

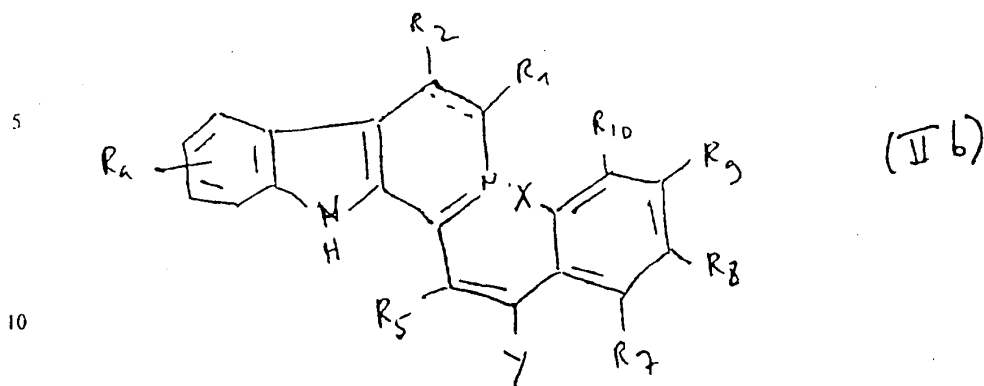


(composé 7)



(composé 8)

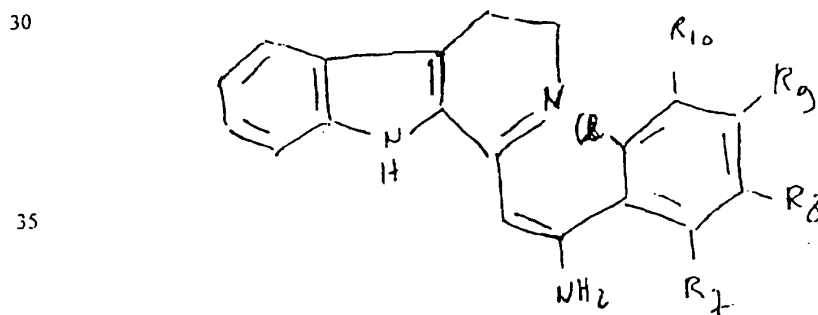
20. Dérivés de formule générale (IIb) suivante :



15 dans laquelle R_4 , R_1 , R_2 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , X et Y sont tels que définis ci-dessus, et notamment les composés de formule (IIb) dans laquelle :

- R_4 représente un atome d'hydrogène,
- R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène, et il n'y a pas de double liaison entre les deux carbones portant R_1 et R_2 ,
- R_5 représente un atome d'hydrogène,
- R_7 , R_8 , R_9 et R_{10} représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- Y représente $-NH_2$,
- X représente un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor.

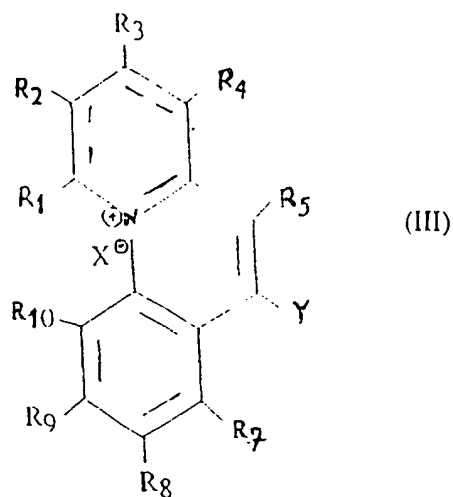
21. Dérivés selon la revendication 20, de formule générale (IIb) choisis parmi les suivants :



86

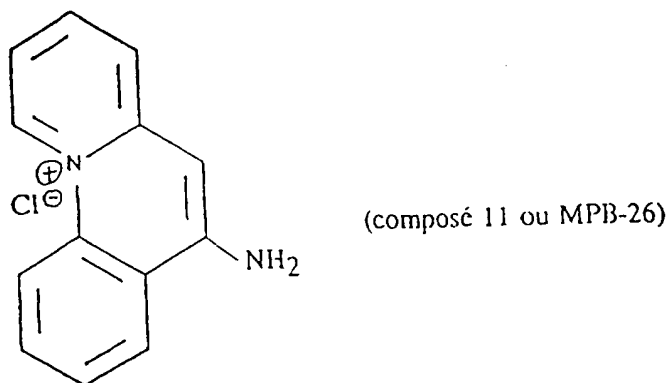
- composé A : $R_7 = \text{Cl}$, $R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé B : $R_7 = R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé C : $R_8 = \text{Cl}$, $R_7 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé D : $R_9 = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$,
- composé E : $R_{10} = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_9 = \text{H}$,
- composé F : $R_9 = \text{Br}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$.

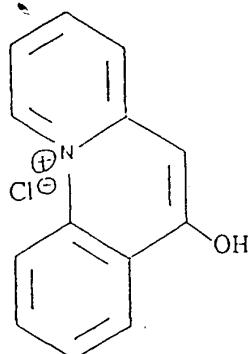
22. Dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (III) suivante :



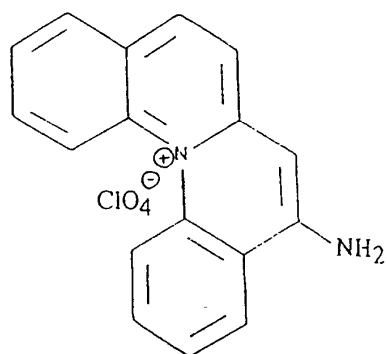
dans laquelle $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7, R_8, R_9, R_{10}, X$ et Y sont tels que définis dans la revendication 1,

les composés de formule suivante étant exclus :

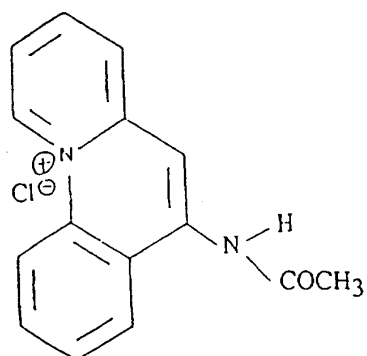




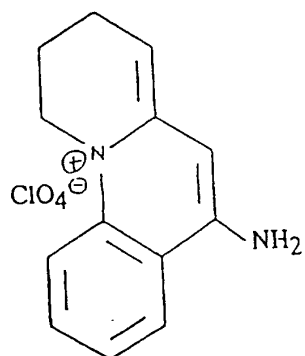
(composé 12 ou MPB-05)



(composé 22)

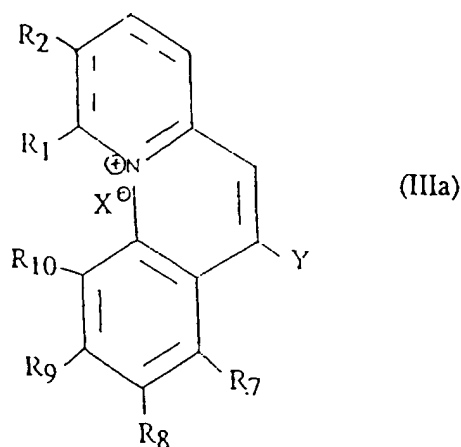


(composé 23)



(composé 24)

23. Dérivés selon la revendication 22, de formule générale (IIIa) suivante :



dans laquelle :

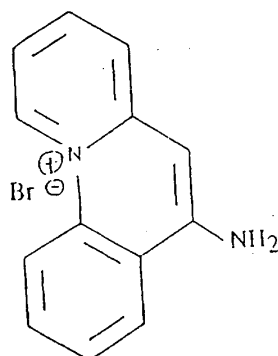
- 15
- R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C₁ et C₂ un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,
 - Y représente un groupe -OH ou -NH₂, ou -NHCOCH₃,
 - R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R₇, R₈, R₉ ou R₁₀, représente un atome d'halogène, notamment un atome de
- 20
- chlore, de brome ou de fluor,
 - X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, notamment un perchlorate ClO₄⁻.

24. Dérivés selon la revendication 23, de formule (IIIa) dans laquelle :

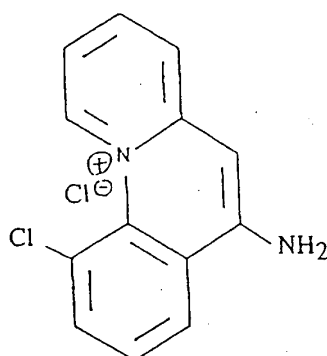
- 25
- R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène,
 - Y représente un groupe -OH,
 - X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme
- 30
- anionique, notamment un perchlorate ClO₄⁻,
 - R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent indépendamment les uns des autres un atome d'hydrogène ou un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor.

25. Dérivés des benzo[c]quinoliziniums selon l'une des revendications 22 à 24, de formule générale (IIIa) choisis parmi les suivants :

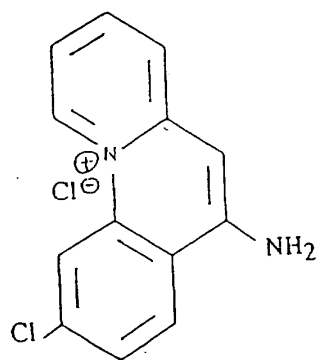
35



(composé 13 ou MPB-01)

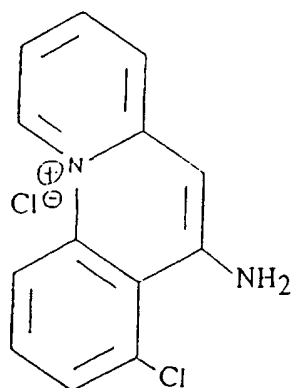


(composé 14 ou MPB-02)



(composé 15 ou MPB-03)

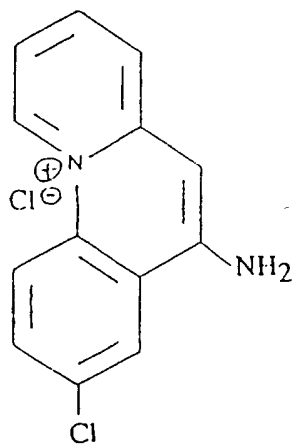
5



(composé 16)

10

15

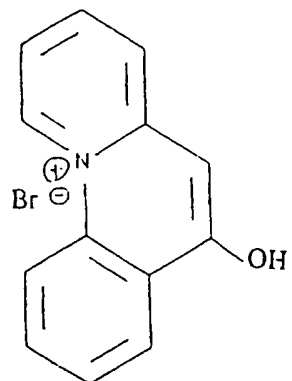


(composé 17)

20

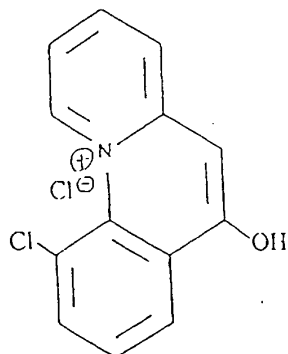
25

30

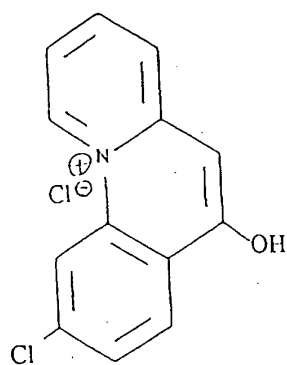


(composé 18 ou MPB-06)

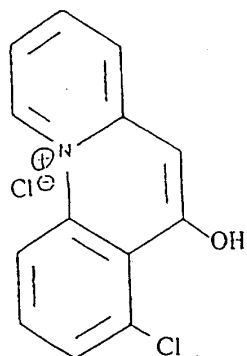
35



(composé 19 ou MPB-07)

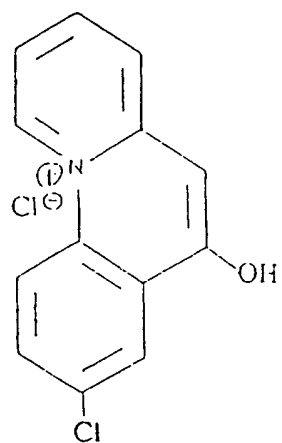


(composé 20 ou MPB-08)



(composé 21 ou MPB-27)

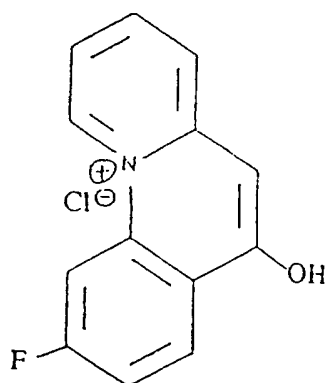
5



(composé 25 ou MPB-30)

10

15

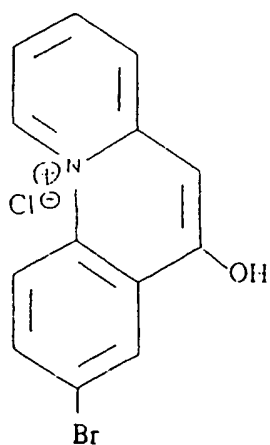


(composé 26 ou MPB-29)

20

25

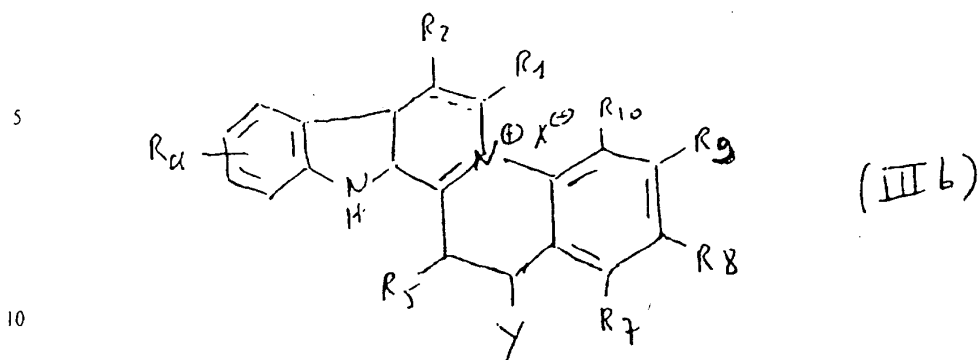
30



(composé 27 ou MPB-32)

35

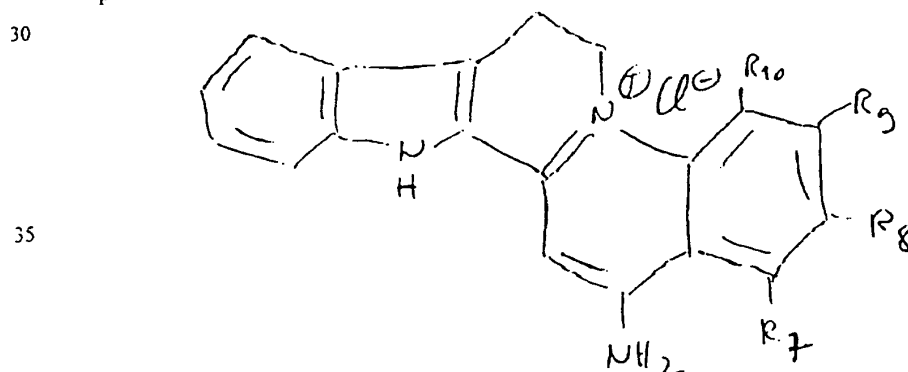
26. Dérivés selon la revendication 22, de formule générale (IIIb) suivante :



15 dans laquelle R_a , R_1 , R_2 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , X et Y sont tels que définis ci-dessus, et notamment les composés de formule (IIIb) dans laquelle :

- R_a représente un atome d'hydrogène,
- R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène, et il n'y a pas de double liaison entre les deux carbones portant R_1 et R_2 ,
- R_5 représente un atome d'hydrogène,
- 20 - R_7 , R_8 , R_9 et R_{10} représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- Y représente $-NH_2$,
- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un
- 25 atome de brome Br^- , ou de chlore Cl^- , ou un groupe d'atomes sous forme anionique, notamment un perchlorate ClO_4^- .

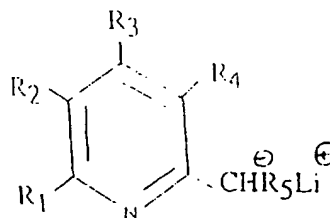
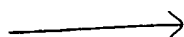
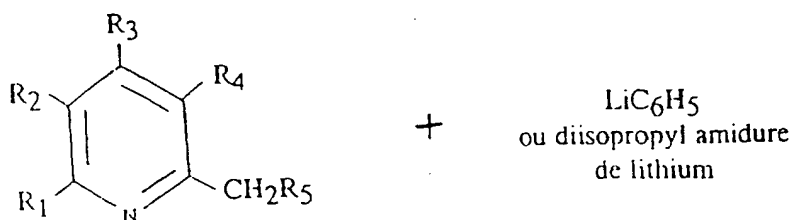
27. Dérivés selon la revendication 26, de formule générale (IIIb) choisis parmi les suivants :



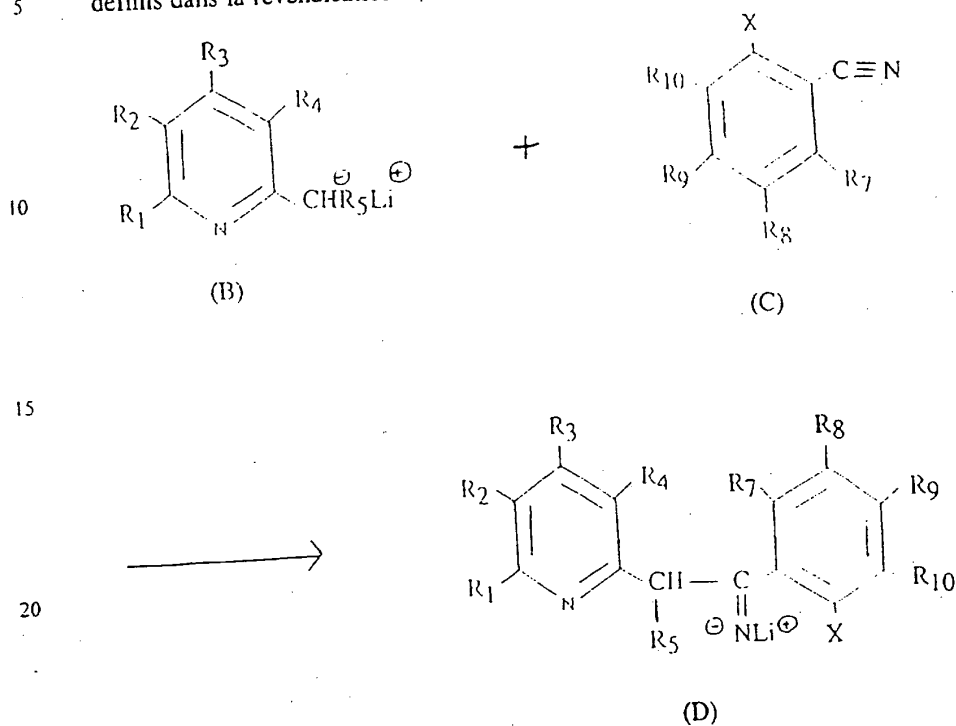
- composé G : $R_7 = \text{Cl}$, $R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé H : $R_7 = R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé I : $R_8 = \text{Cl}$, $R_7 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,
- composé J : $R_9 = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$,
- 5 - composé K : $R_{10} = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_9 = \text{H}$,
- composé L : $R_9 = \text{Br}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$.

28. Procédé de préparation de dérivés tels que définis dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

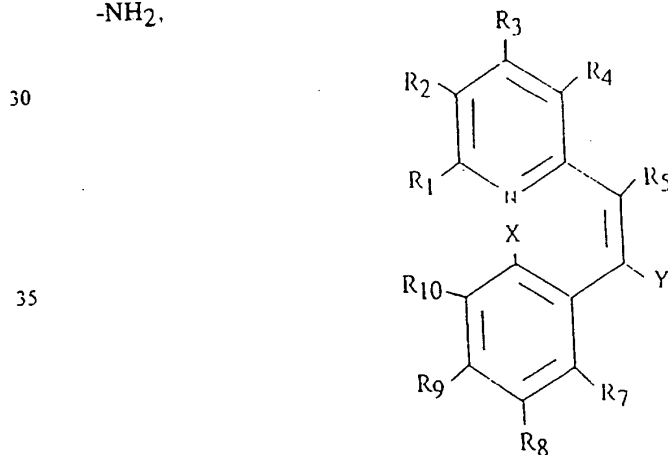
- 10 - traitement du dérivé de formule (A) dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , et R_5 , sont tels que définis dans la revendication 1, par le phényllithium ou le diisopropyl amidure de lithium, avantageusement dans l'éther ou le THF, ce qui conduit à l'obtention de dérivés de formule (B) dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , et R_5 , sont tels que définis dans la revendication 1, selon le schéma réactionnel
- 15 suivant:



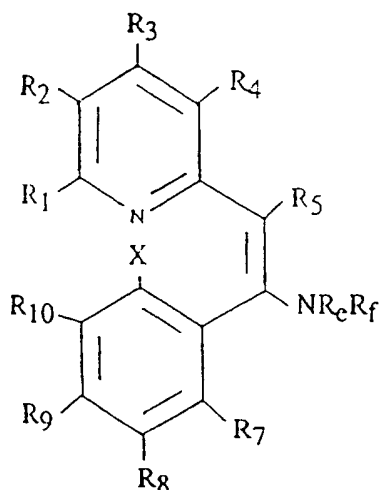
- condensation du dérivé de formule (B) obtenu à l'étape précédente avec le dérivé de formule (C) dans laquelle R₇, R₈, R₉, R₁₀, et X sont tels que définis dans la formule (I), ce qui conduit à l'obtention de dérivés de formule (B) dans laquelle R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₇, R₈, R₉, R₁₀, et X sont tels que définis dans la revendication 1, selon le schéma réactionnel suivant :



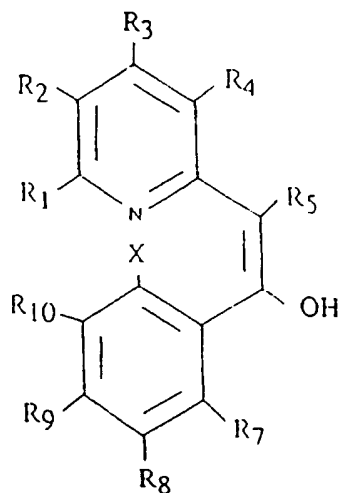
25 - traitement du composé de formule (D) par addition d' H_2O , ce qui conduit à l'obtention du dérivé de formule (II) suivante, dans laquelle R₁ à R₅, R₇ à R₁₀, et X sont tels que définis dans la revendication 1, et Y représente $-\text{NH}_2$.



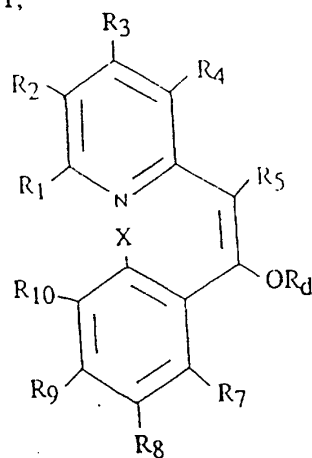
- le cas échéant, traitement du composé de formule (II) susmentionnée, par un dérivé comportant les groupes R_e et R_f tels que définis dans la revendication 1, ce dérivé étant susceptible de réagir avec l'atome d'azote lié au carbone en position 6 du composé de formule (II) susmentionnée, notamment par un halogénure de R_e et/ou de R_f tout en ayant, si nécessaire, pris soin de protéger au préalable celles des autres fonctions présentes sur le composé de formule (II) susmentionnée et susceptibles de réagir avec le dérivé comportant les groupes R_e et R_f susmentionnés, ce qui conduit à l'obtention du composé de formule (II) suivante dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis ci-dessus, et Y représente un groupe $-NR_eR_f$ tel que défini dans la revendication 1,



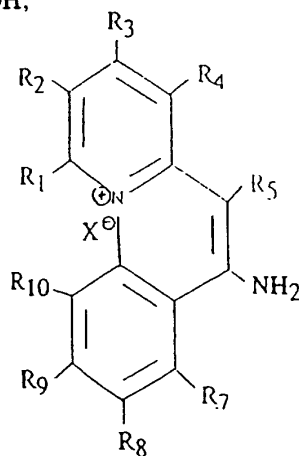
- le cas échéant, hydrolyse, notamment par action de l'acide sulfurique (pH3) à 40°C, du composé de formule (II) susmentionnée dans laquelle Y représente NH_2 , ce qui conduit à l'obtention du composé de formule (II) suivante, dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis dans la revendication 1, et Y représente un groupe $-OH$,



- le cas échéant, traitement du composé de formule (II) susmentionnée, dans laquelle Y représente un groupe -OH, par un dérivé comportant le groupe R_d , tel que défini dans la revendication 1, ce dérivé étant susceptible de réagir avec l'atome d'oxygène lié au carbone en position 7 du composé de formule (II) susmentionnée, notamment par un halogénure de R_d , tout en ayant, si nécessaire, pris soin de protéger au préalable celles des autres fonctions présentes sur le composé de formule (II) susmentionnée et susceptibles de réagir avec le dérivé comportant le groupe R_d susmentionné, ce qui conduit à l'obtention du composé de formule (II) suivante dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis ci-dessus, et Y représente un groupe $-OR_d$ tel que défini dans la revendication 1,



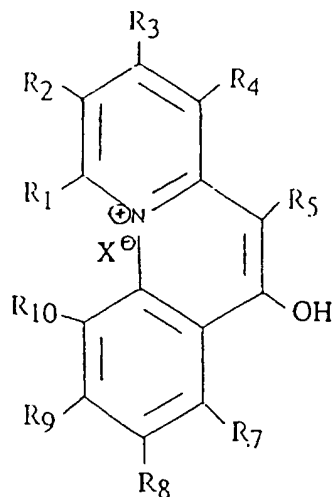
- le cas échéant, chauffage, avantageusement à 200°C, des composés de formule (II) susmentionnée dans laquelle Y représente $-NH_2$ ou $-OH$, ce qui conduit respectivement aux composés de formules (III) suivantes, dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis dans la revendication 1, et Y représente un groupe $-NH_2$ ou $-OH$,



98

5

10



15

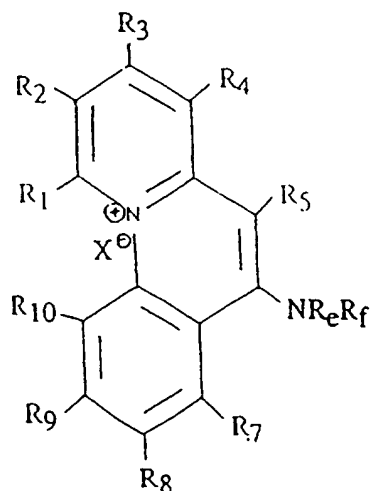
20

25

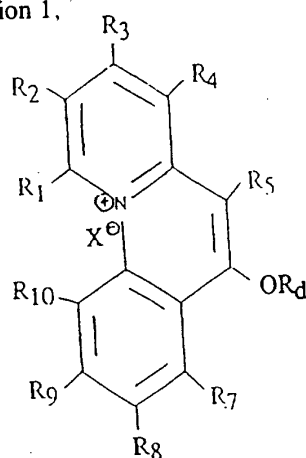
- le cas échéant, traitement du composé de formule (III) susmentionnée, dans laquelle Y représente un groupe -NH_2 , par un dérivé comportant les groupes R_e et R_f tels que définis dans la revendication 1, ce dérivé étant susceptible de réagir avec l'atome d'azote lié au carbone en position 6 du composé de formule (III) susmentionnée, notamment par un halogénure de R_e et/ou de R_f , tout en ayant, si nécessaire, pris soin de protéger au préalable celles des autres fonctions présentes sur le composé de formule (III) susmentionnée et susceptibles de réagir avec le dérivé comportant les groupes R_e et R_f susmentionnés, ce qui conduit à l'obtention du composé de formule (III) suivante dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis ci-dessus, et Y représente un groupe $\text{-NR}_e\text{R}_f$ tel que défini dans la revendication 1,

30

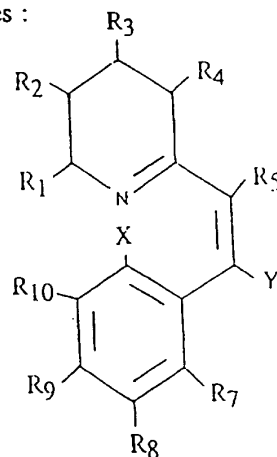
35



- le cas échéant, traitement du composé de formule (III) susmentionnée, dans laquelle Y représente un groupe -OH, par un dérivé comportant le groupe R_d , tel que défini dans la revendication 1, ce dérivé étant susceptible de réagir avec l'atome d'oxygène lié au carbone en position 7 du composé de formule (III) susmentionnée, notamment par un halogénure de R_d , tout en ayant, si nécessaire, pris soin de protéger au préalable celles des autres fonctions présentes sur le composé de formule (III) susmentionnée et susceptibles de réagir avec le dérivé comportant le groupe R_d susmentionné, ce qui conduit à l'obtention du composé de formule (III) suivante dans laquelle R_1 à R_5 , R_7 à R_{10} , et X sont tels que définis ci-dessus, et Y représente un groupe -OR_d tel que défini dans la revendication 1,



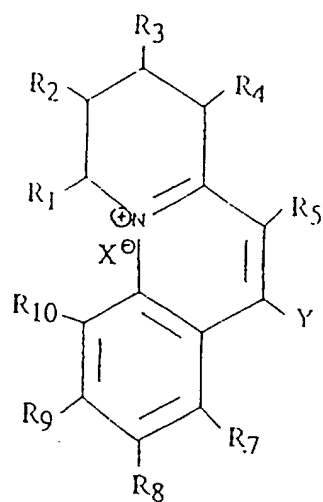
- le cas échéant, hydrogénation des composés de formules (II) ou (III) susmentionnées, notamment par hydrogénation catalytique en présence d'oxyde de platine à pression réduite, ce qui conduit à l'obtention des composés de formules (II) ou (III) suivantes :



100

5

10



15

dans lesquelles R₁ à R₅, R₇ à R₁₀, X et Y sont tels que définis ci-dessus.

1/12

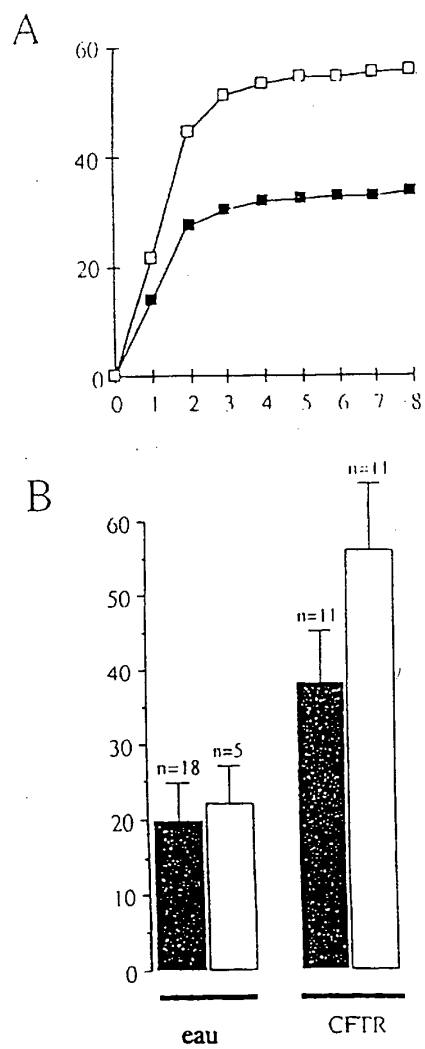


Figure 1

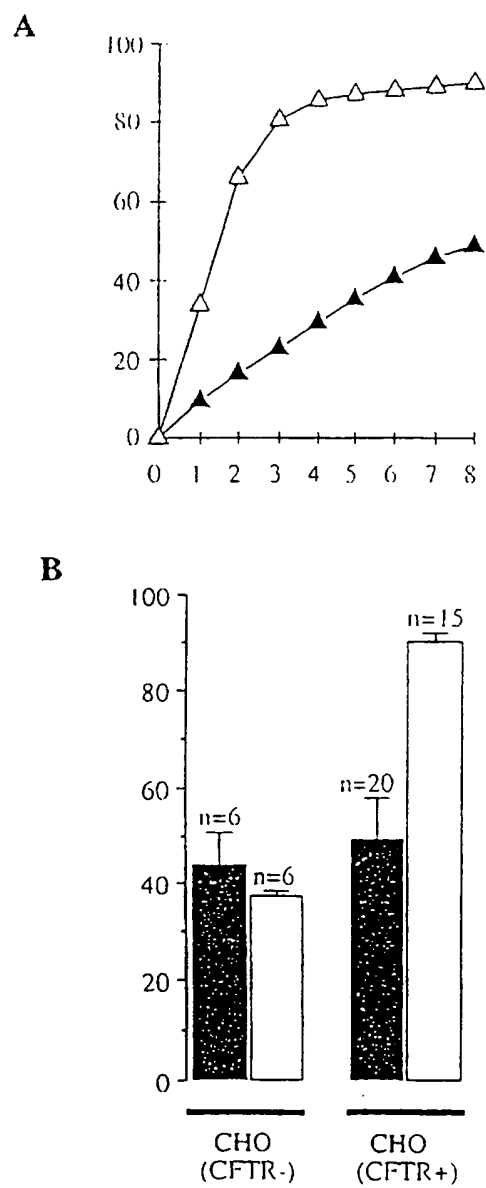
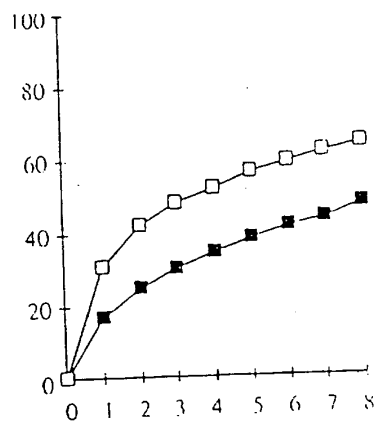


Figure 2

3/12

A



B

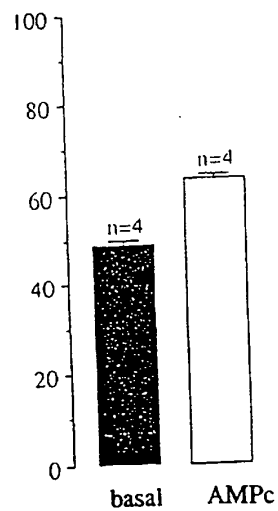


Figure 3

4/12

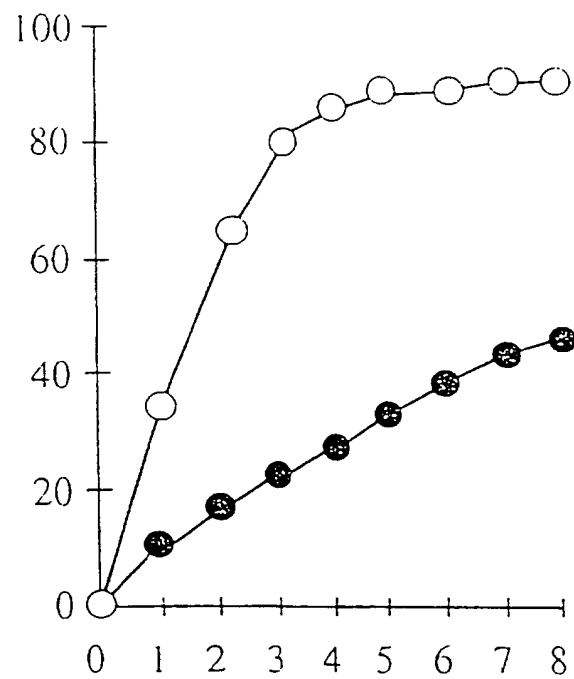


Figure 4

5/12

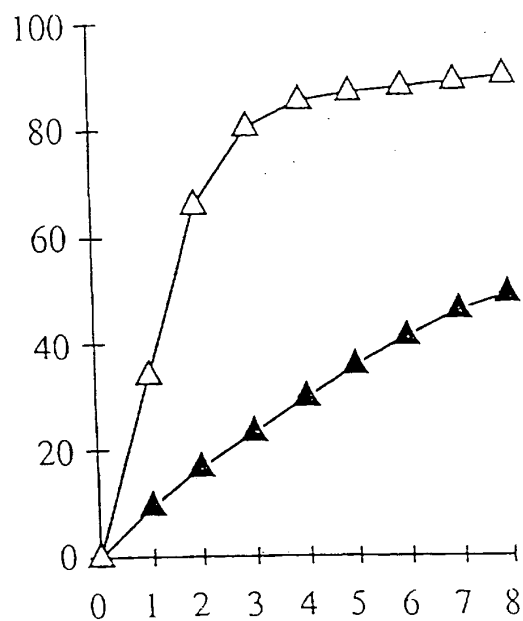


Figure 5

6/12

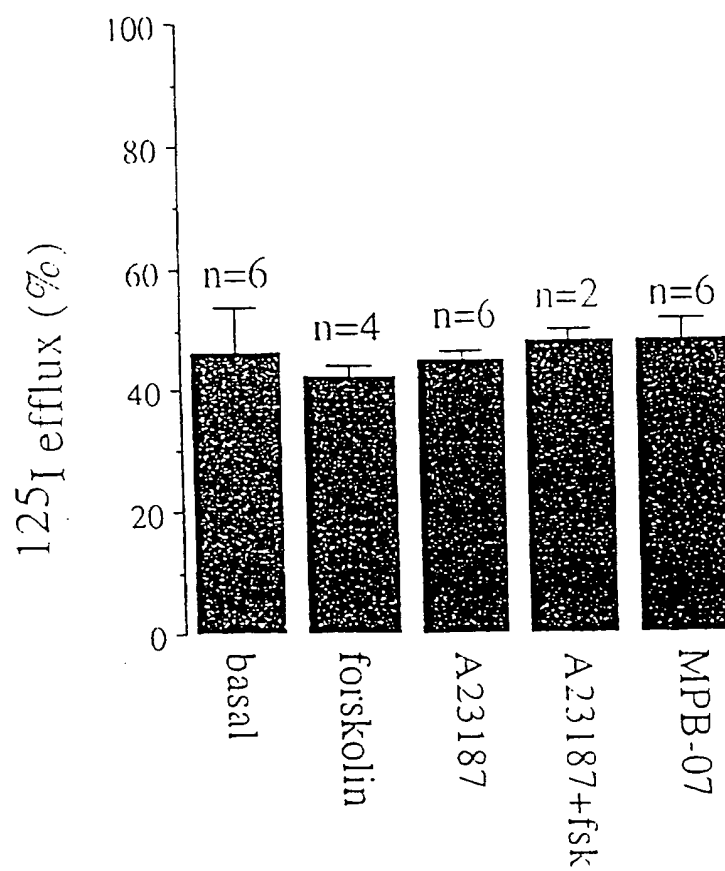


Figure 6

7/12

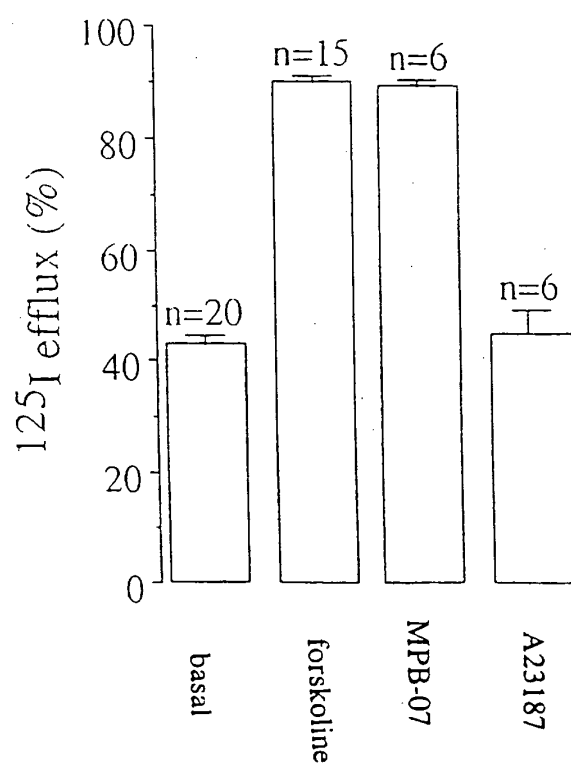
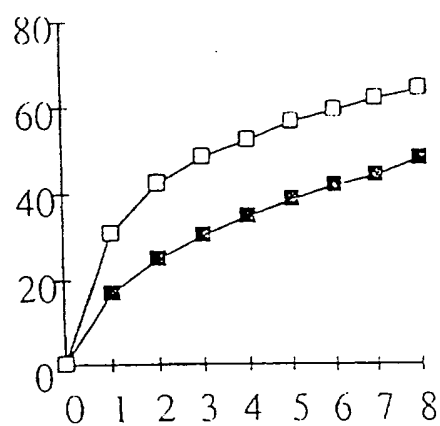


Figure 7

8/12

A



B

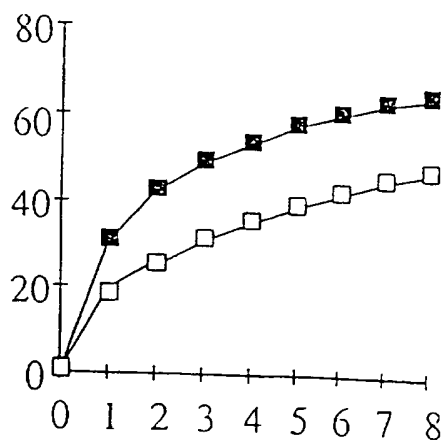


Figure 8

9/12

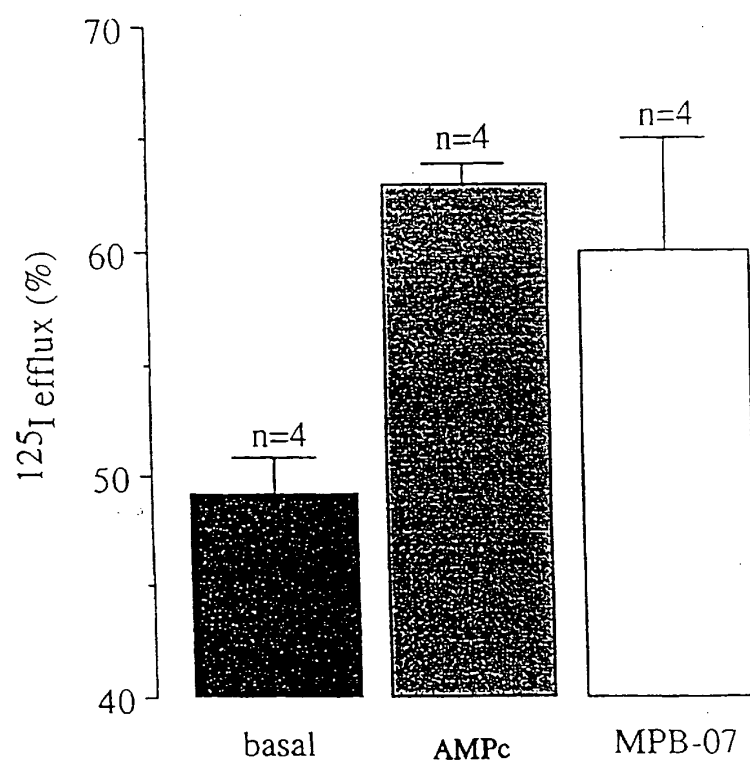
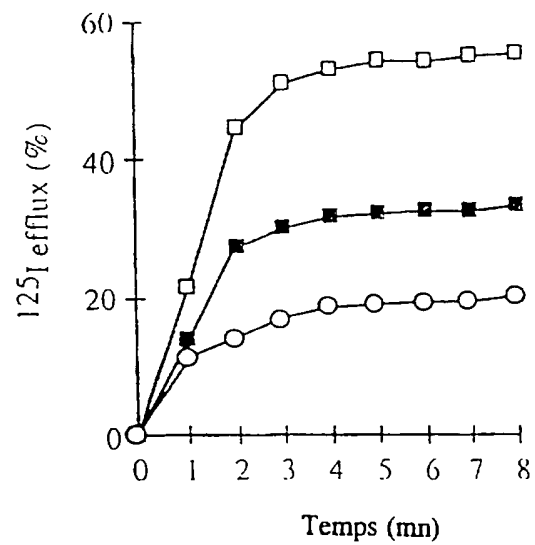


Figure 9

10/12

A



B

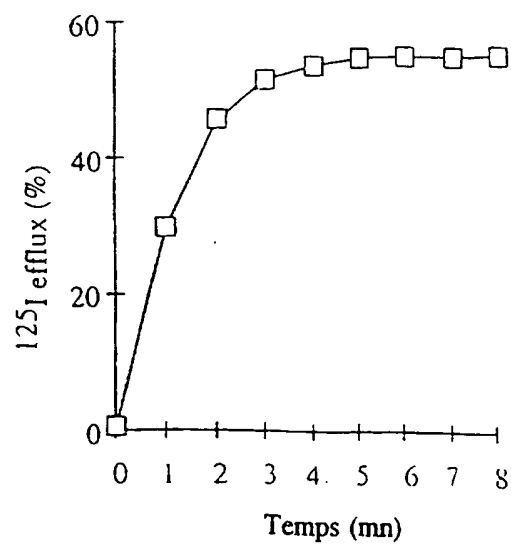


Figure 10

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

11/12

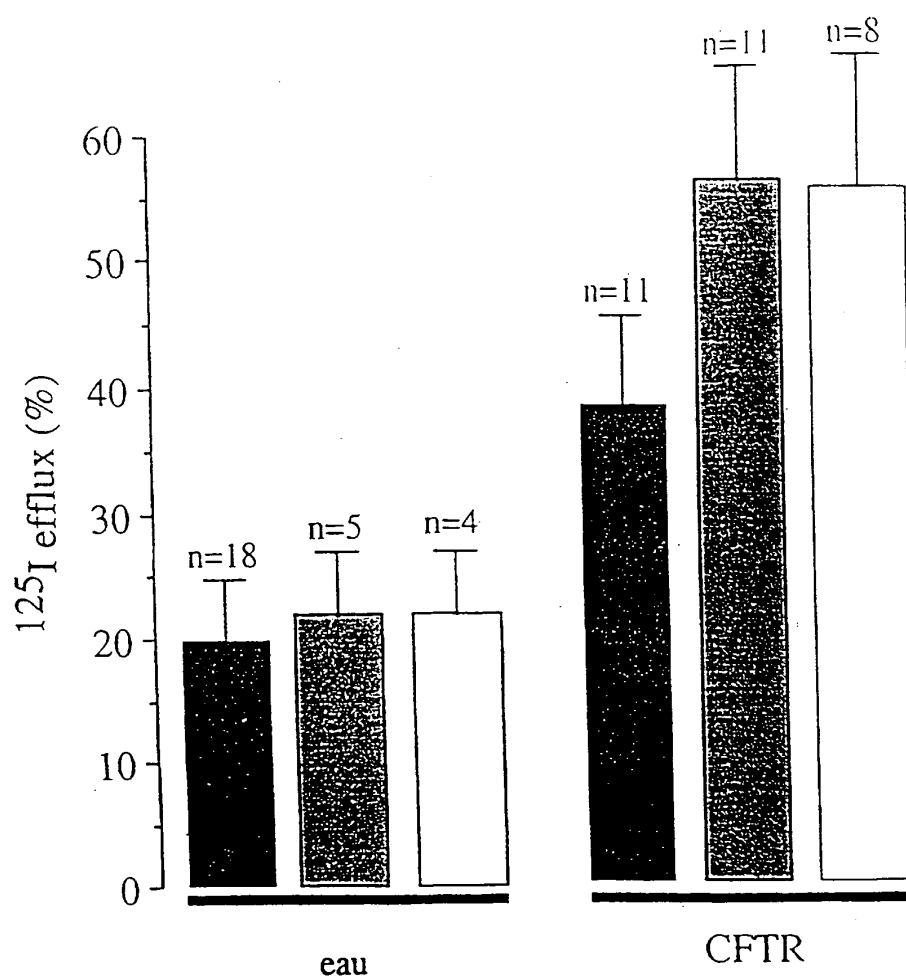


Figure 11

12/12

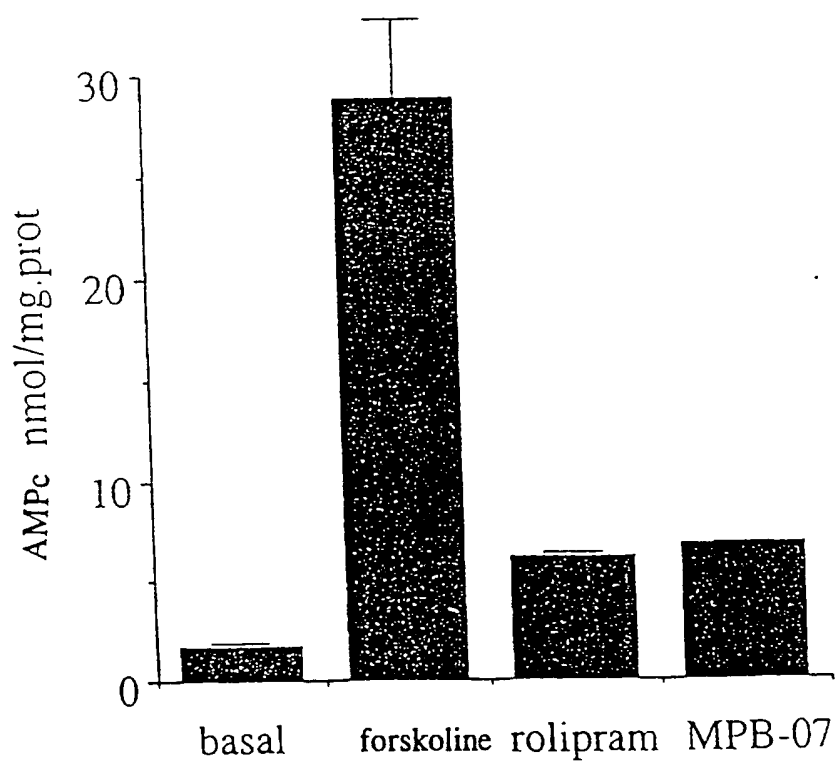


Figure 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/FR 97/01436

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07D213/30 C07D213/38 C07D213/40 C07D215/14 C07D215/12
C07D471/04 A61K31/47 C07D213/36 C07D471/14 A61K31/475

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 15, 10 April 1989 Columbus, Ohio, US; abstract no. 135039, XP002021980 see abstract & I.Y. MAINAGASHEV ET AL.: KHIM. GETEROTSIKL. SOEDIN., no. 4, 1988, pages 514-520, * CAS REGISTRY CN 119388-44-2; 1531-38-0 * --- -/--	14



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 November 1997

Date of mailing of the international search report

21. 11. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Frelon, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 97/01436

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 7, 16 February 1987 Columbus, Ohio, US; abstract no. 49539, XP002021985 see abstract & V.V. LAPACHEV ET AL.: KHIM. GETEROSIKL. SOEDIN., no. 6, 1986, pages 802-809, * CAS REGISTRY CN 106259-98-7 *	14
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, no. 5, 4 August 1980 Columbus, Ohio, US; abstract no. 46363, XP002021990 see abstract & T. KONAKAHARA ET AL.: HETEROCYCLES, vol. 14, no. 4, 1980, pages 393-396, * CAS REGISTRY Cns 13314-42-6; 74115-43-8 *	14
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 92, no. 3, 21 January 1980 Columbus, Ohio, US; abstract no. 21823k, XP002045767 see abstract & E.H. SUND ET AL.: TEX. J. SCI., vol. 31, no. 3, 1979, pages 294-295, * CAS REGISTRY Cns 366-62-1; 72052-99-4; 72053-00-0; 72053-01-1; 74115-43-8; 10420-99-2 *	18
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 91, no. 21, 19 November 1979 Columbus, Ohio, US; abstract no. 175163m, XP002045768 see abstract & J.-M. VIERFOND ET AL.: J. HETEROCYCL. CHEM., vol. 16, no. 4, 1979, pages 753-755, * CAS REGISTRY Cns 71711-62-1; 71711-66-5; 100398-32-1 *	18
	--- -/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent Application No.

/FR 97/01436

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 81, no. 11, 16 September 1974 Columbus, Ohio, US; abstract no. 63583k, XP002045769 see abstract & J.F. WOLFE ET AL.: JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 39, no. 14, 1974, EASTON US, pages 2006-2010, * CAS REGISTRY CN 51425-11-7 *	18
X	--- A.R.E. CAREY ET AL.: JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 2, vol. 11, 1993, LETCHWORTH GB, pages 2285-2296, XP002045764 see page 2292; table 4	18
X	--- T. KONAKAHARA ET AL.: JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1, vol. 7, 1987, LETCHWORTH GB, pages 1489-1493, XP002045765 see page 1489; examples 5A,5B	18
X	--- R.A.M. O'FERRALL ET AL.: JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 2, vol. 12, 1994, LETCHWORTH GB, pages 2461-2470, XP002045766 see page 2461; example 2	18
X,P	--- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 012, 26 December 1996 & JP 08 198875 A (CHUGAI PHARMACEUT. CO., LTD.), 6 August 1996, voir CAS REGISTRY CN 182252-01-3 see abstract	18
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 19, 9 May 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 241028s, XP002045770 see abstract & M.J. STUTTS ET AL.: J. BIOL. CHEM., vol. 269, no. 12, 1994, pages 8667-8674,	1-28

3

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

al Application No

PCT/FR 97/01436

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	F. BECQ ET AL.: PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 91, September 1994, pages 9160-9164, XP000611989 cited in the application see the whole document ---	1-28
A	WO 94 03431 A (LEO PHARMACEUTICAL PRODUCTS LTD. A/S) 17 February 1994 see page 5; claims ---	1-28
A	EP 0 480 717 A (MERCK FROSST CANADA INC.) 15 April 1992 see abstract; claims ---	1-28
A	WO 96 16084 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 30 May 1996 see abstract -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 97/1436

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet continuation of information PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

Claims Nos.: 1,2,5,7,11,13-17,20,22,26

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The considerable number of theoretically conceivable compounds by combining the various definitions of substituents as claimed make it impossible to carry out a complete search. Moreover such uncertainty as to the claimed field can give use to contradictions and raise doubt as to unity. Following the description, the search has been therefore limited to the field (ICP classification) effectively illustrated by the examples explicitly given in the application.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

FR 97/01436

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9403431 A	17-02-94	AT 149030 T	15-03-97
		AU 666967 B	29-02-96
		AU 4698293 A	03-03-94
		CA 2134565 A	17-02-94
		DE 69308212 D	27-03-97
		DE 69308212 T	18-09-97
		EP 0654026 A	24-05-95
		ES 2100550 T	16-06-97
		FI 950515 A	06-02-95
		JP 8504749 T	21-05-96
		NZ 254741 A	27-07-97
		US 5576438 A	19-11-96
EP 480717 A	15-04-92	AU 639610 B	29-07-93
		AU 8579491 A	16-04-92
		CA 2053209 A	13-04-92
		CN 1061407 A	27-05-92
		CS 9103095 A	15-04-92
		HU 61981 A	29-03-93
		HU 9500178 A	28-08-95
		JP 2501385 B	29-05-96
		JP 5105665 A	27-04-93
		NZ 240194 A	28-03-95
		US 5565473 A	15-10-96
		NO 180086 B	04-11-96
WO 9616084 A	30-05-96	NO 960426 A,B,	09-02-93
		AU 4146096 A	17-06-96
		EP 0794963 A	17-09-97

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
T/FR 97/01436

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 C07D213/30 C07D213/38 C07D213/40 C07D215/14 C07D215/12
 C07D471/04 A61K31/47 C07D213/36 C07D471/14 A61K31/475

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07D A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 15, 10 avril 1989 Columbus, Ohio, US; abstract no. 135039, XP002021980 voir abrégé & I.Y. MAINAGASHEV ET AL.: KHIM. GETEROTSIKL. SOEDIN., no. 4, 1988, pages 514-520, * CAS REGISTRY CN 119388-44-2; 1531-38-0 * --- -/-	14

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 novembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21.11.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Frelon, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

internationale No

PCT/FR 97/01436

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 7, 16 février 1987 Columbus, Ohio, US; abstract no. 49539, XP002021985 voir abrégé & V.V. LAPACHEV ET AL.: KHIM. GETEROSIKL. SOEDIN., no. 6, 1986, pages 802-809, * CAS REGISTRY CN 106259-98-7 *	14
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, no. 5, 4 août 1980 Columbus, Ohio, US; abstract no. 46363, XP002021990 voir abrégé & T. KONAKAHARA ET AL.: HETEROCYCLES, vol. 14, no. 4, 1980, pages 393-396, * CAS REGISTRY CNs 13314-42-6; 74115-43-8 *	14
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 92, no. 3, 21 janvier 1980 Columbus, Ohio, US; abstract no. 21823k, XP002045767 voir abrégé & E.H. SUND ET AL.: TEX. J. SCI., vol. 31, no. 3, 1979, pages 294-295, * CAS REGISTRY CNs 366-62-1; 72052-99-4; 72053-00-0; 72053-01-1; 74115-43-8; 10420-99-2 *	18
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 91, no. 21, 19 novembre 1979 Columbus, Ohio, US; abstract no. 175163m, XP002045768 voir abrégé & J.-M. VIERFOND ET AL.: J. HETEROCYCL. CHEM., vol. 16, no. 4, 1979, pages 753-755, * CAS REGISTRY CNs 71711-62-1; 71711-66-5; 100398-32-1 *	18

3

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Date internationale No
/FR 97/01436

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 81, no. 11, 16 septembre 1974 Columbus, Ohio, US; abstract no. 63583k, XP002045769 voir abrégé & J.F. WOLFE ET AL.: JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 39, no. 14, 1974, EASTON US, pages 2006-2010, * CAS REGISTRY CN 51425-11-7 *	18
X	--- A.R.E. CAREY ET AL.: JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 2, vol. 11, 1993, LETCHWORTH GB, pages 2285-2296, XP002045764 voir page 2292; tableau 4	18
X	--- T. KONAKAHARA ET AL.: JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1, vol. 7, 1987, LETCHWORTH GB, pages 1489-1493, XP002045765 voir page 1489; exemples 5A,5B	18
X	--- R.A.M. O'FERRALL ET AL.: JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 2, vol. 12, 1994, LETCHWORTH GB, pages 2461-2470, XP002045766 voir page 2461; exemple 2	18
X,P	--- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 012, 26 décembre 1996 & JP 08 198875 A (CHUGAI PHARMACEUT. CO., LTD.), 6 août 1996, voir CAS REGISTRY CN 182252-01-3 voir abrégé	18
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 19, 9 mai 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 241028s, XP002045770 voir abrégé & M.J. STUTTS ET AL.: J. BIOL. CHEM., vol. 269, no. 12, 1994, pages 8667-8674,	1-28

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

internationale No
PCT/FR 97/01436

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	F. BECQ ET AL.: PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 91, septembre 1994, pages 9160-9164, XP000611989 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-28
A	WO 94 03431 A (LEO PHARMACEUTICAL PRODUCTS LTD. A/S) 17 février 1994 voir page 5; revendications ---	1-28
A	EP 0 480 717 A (MERCK FROSST CANADA INC.) 15 avril 1992 voir abrégé; revendications ---	1-28
A	WO 96 16084 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 30 mai 1996 voir abrégé -----	1-28

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

Claims Nos.: 1,2,5,7,11,13-17,20,22,26

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Le nombre considérable de composés théoriquement concevable en combinant les diverses définitions de substituants telles que revendiquées rendent une recherche complète impossible. Par ailleurs une telle incertitude sur le domaine revendiqué peut être source de contradictions et mettre en doute l'unité. Guidée par la description, la recherche s'est donc limitée au domaine (classes CIB) effectivement illustré par les exemples explicitement donnés dans la demande.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements fournis aux membres de familles de brevets

Formulaire international No

PCT/FR 97/01436

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9403431 A	17-02-94	AT 149030 T	15-03-97
		AU 666967 B	29-02-96
		AU 4698293 A	03-03-94
		CA 2134565 A	17-02-94
		DE 69308212 D	27-03-97
		DE 69308212 T	18-09-97
		EP 0654026 A	24-05-95
		ES 2100550 T	16-06-97
		FI 950515 A	06-02-95
		JP 8504749 T	21-05-96
		NZ 254741 A	27-07-97
		US 5576438 A	19-11-96
EP 480717 A	15-04-92	AU 639610 B	29-07-93
		AU 8579491 A	16-04-92
		CA 2053209 A	13-04-92
		CN 1061407 A	27-05-92
		CS 9103095 A	15-04-92
		HU 61981 A	29-03-93
		HU 9500178 A	28-08-95
		JP 2501385 B	29-05-96
		JP 5105665 A	27-04-93
		NZ 240194 A	28-03-95
		US 5565473 A	15-10-96
		NO 180086 B	04-11-96
WO 9616084 A	30-05-96	NO 960426 A, B,	09-02-93
		AU 4146096 A	17-06-96
		EP 0794963 A	17-09-97

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)